



Universidade Nova de Lisboa
Faculdade de Ciências Médicas

Mestrado em Doenças Transmissíveis

SEROPREVALÊNCIA DE CÓLERA EM ÁREA ENDÊMICA

**Estudo de uma População Adulta na
Cidade da Beira (Moçambique)**

Ana Glória Rodrigues Sanches da Fonseca
Sob orientação de Prof. Doutor João Luís Baptista

2007

Agradecimentos

Professor Doutor Jorge Torgal Garcia

Prof. Doutor João Luís Baptista

Prof. Doutora Filomena Exposto

Dr. Jean-Michel Fournier

Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis – Universidade Nova de Lisboa

Instituto Pasteur de Paris – Unidade de Cólera e Vibriões – Centro de Referência Nacional da Cólera e Vibriões

Departamento Universitário de Saúde Pública – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Nova de Lisboa

Ministério da Saúde da República Democrática de Moçambique

Direcção Provincial de Saúde da Província de Sofala – República Democrática de Moçambique.

ÍNDICE

RESUMO	4
INTRODUÇÃO	5
A CÓLERA – IMPACTO GLOBAL E PERSPECTIVA HISTÓRICA	5
A CÓLERA – MICROBIOLOGIA	7
A CÓLERA – DA PATOGÉNESE AO QUADRO CLÍNICO	9
A CÓLERA – DIAGNÓSTICO	11
A CÓLERA – EPIDEMIOLOGIA E ECOLOGIA	13
A CÓLERA – IMUNIDADE: APLICAÇÃO À SERO-EPIDEMIOLOGIA E À VACINAÇÃO	16
A CÓLERA – ESTRATÉGIAS DE PREVENÇÃO E COMBATE	21
A CÓLERA – ANÁLISE DA SITUAÇÃO NO CONTINENTE AFRICANO	24
A CÓLERA – ANÁLISE DA SITUAÇÃO EM MOÇAMBIQUE E NA CIDADE DA BEIRA	25
FINALIDADE.....	33
OBJECTIVOS ESPECÍFICOS	33
MATERIAIS E MÉTODOS	34
TIPO DE ESTUDO	34
LOCAL DO ESTUDO	34
POPULAÇÃO – ALVO	34
AMOSTRA	34
VARIÁVEIS E SUA OPERACIONALIZAÇÃO	35
DESCRIÇÃO METODOLÓGICA	35
<i>Poder vibriocida – método simplificado em microplacas para detecção de anticorpos vibriocida para Vibrio cholerae O1</i>	<i>37</i>
ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS	41
INSTRUMENTO DE NOTAÇÃO	41
APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	42
DISCUSSÃO.....	45
DISCUSSÃO METODOLÓGICA	45
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	49
<i>Cidade da Beira – Que estratégia para o controlo da Cólera?.....</i>	<i>60</i>
CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	69
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXOS.....	75
ANEXO 1 – FÓRMULAS PARA REALIZAÇÃO DOS MEIOS E PRODUTOS LABORATORIAIS	75
ANEXO 2 – INSTRUMENTOS DE NOTAÇÃO	79

RESUMO

Ao longo da história, a cólera tem assolado populações sob a forma de epidemias e pandemias com elevada morbimortalidade, que condicionam o desenvolvimento das regiões atingidas (120.000 óbitos estimados por ano a nível mundial). Em 2001, 94% (173.359 casos) dos casos de cólera foram notificados no continente africano (OMS). A cidade da Beira é considerada área de endemo-epidemicidade de cólera.

Na cidade da Beira foi realizado um estudo de seroprevalência de cólera (serogrupo O1), em período inter-epidémico, através do doseamento de anticorpos vibriocida, numa amostra de conveniência de 136 indivíduos adultos sem história de vacinação prévia contra a cólera. Obteve-se uma seroprevalência de 2,2%, que não pode ser extrapolada para a população em geral. Ambas as estirpes do serogrupo O1 (Inaba e Ogawa) foram identificadas.

A metodologia utilizada é exequível em regiões com suporte laboratorial básico e pode ter interesse como ferramenta de vigilância epidemiológica da cólera na cidade da Beira, dado que a seroprevalência em anticorpos vibriocida traduz a imunidade de grupo da população. A monitorização da seroprevalência pode contribuir para orientar as estratégias de intervenção no sentido do controlo da cólera, nomeadamente na implementação de uma campanha de vacinação.

De facto, tendo em conta o impacto da cólera na população e as limitações da estratégia existente, urge equacionar de forma objectiva o papel da vacinação oral na estratégia de controlo da cólera na cidade da Beira.

INTRODUÇÃO

A cólera – Impacto global e perspectiva histórica

Ao longo da história, a cólera tem assolado populações sob a forma de epidemias e pandemias com elevada morbimortalidade. Globalmente, estima-se que a cólera provoca 120.000 óbitos por ano a nível mundial, grande parte deles no continente africano.¹

O papel da água como veículo de transmissão da cólera foi estabelecido por John Snow em 1854, sendo desde então adoptada como modelo de doença transmissível relacionada com a água.² Nesta altura a etiologia da cólera (infecção pelo *Vibrio cholerae*) era ainda desconhecida. As observações de John Snow relacionaram a difusão da doença com o consumo de água distribuída pelas bombas de água locais (água de consumo humano contaminada com a água proveniente dos esgotos). Consta que John Snow terá roubado o manípulo da bomba de água de *Broad Street* (Londres, 1854), o que, ao impedir a sua utilização pela população, pôs termo à epidemia local de cólera.³

As pandemias de cólera estão documentadas desde o século XIX e são desde sempre conotadas com caos e catástrofe, fruto de taxas de incidência e de mortalidade elevadas, desencadeando o temor e o pânico das populações.³ Em 1865, por exemplo, dos 90.000 peregrinos que se deslocaram a Meca, 30.000 faleceram de cólera. Os sobreviventes reintroduziram a cólera na Europa, que provocou, em 1866, 80.000 óbitos na Áustria, 115.000 na Alemanha, 113.000 na Itália, e 90.000 na Rússia, despoletando uma pandemia que só terminou em 1972 (4ª pandemia).³ As primeiras seis pandemias tiveram origem no subcontinente indiano, onde a doença é endémica, e foram atribuídas ao *Vibrio cholerae* O1

biotipo clássico.^{2,3} Durante este período, a cólera não persistiu em nenhuma das áreas geográficas atingidas *de novo*, mantendo-se endémica apenas no continente asiático.⁴

A sétima pandemia decorre desde 1961. É a mais longa da história, já atingiu praticamente o mundo inteiro e originou novas áreas de endemicidade.⁴ Ao contrário das anteriores, a sétima pandemia teve origem na Indonésia e o seu agente etiológico é o *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor.^{2,3} Comparativamente ao biótipo clássico, o El Tor tem maior capacidade de sobreviver em nichos ambientais e está associado a uma taxa de infecção inaparente ou de gravidade ligeira significativamente mais elevada. Isso aumenta a taxa de excretadores assintomáticos e favorece a circulação do vibrião em condições precárias de saneamento e de controlo das águas de consumo humano.^{2,3}

Da Indonésia, a epidemia estendeu-se ao restante arquipélago do sudeste asiático e continente asiático, médio oriente, atingindo a costa ocidental da África subsahariana. A introdução da cólera no continente africano em 1970 associou-se a uma epidemia explosiva com elevadas incidência e letalidade, rápida disseminação a diversos países, e evolução para epidemo – endemicidade.^{2,3,5}

Desde 1973, ao longo do Golfo do Texas e da Louisiana, têm sido identificados casos esporádicos de cólera O1 El Tor sobretudo em profissionais ligados à pesca.⁶ Esta área é presentemente considerada endémica e os casos de cólera foram associados ao consumo de frutos do mar contaminados.^{2,6}

Em 1991 atingiu a América do Sul, onde não se registavam casos de cólera há mais de cem anos^{3,5}. A epidemia teve início no Peru, e alastrou rapidamente ao longo da costa do Pacífico, estendendo-se à América central.^{3,5}

Em 1992, num surto epidémico na Índia e Bangladesh, foi identificado um novo serogrupo, *Vibrio cholerae* O139, associado a um quadro clínico em tudo

equivalente ao provocado pelo serogrupo O1.^{2,3,4,5} Presentemente mantém-se praticamente restrito ao continente asiático, mas poderá representar o início de uma oitava pandemia.²

Clinicamente, a cólera caracteriza-se por diarreia aquosa profusa com rápida evolução para choque hipovolémico e morte. Afecta de igual modo adultos e crianças. Dissemina-se de forma explosiva nas populações, evoluindo rapidamente para epidemias massivas e globais prolongadas que ultrapassam a capacidade das infra-estruturas de saúde e comprometem o contexto político, económico e social das regiões atingidas.¹

A endemicidade e epidemicidade da cólera estão estreitamente relacionadas com as condições precárias de saneamento.^{1,2,3} O tratamento adequado da doença poupa vidas humanas mas não tem impacto na história natural da doença nem na difusão da infecção.¹ Estas características fazem da cólera um problema pertinente de saúde pública, tanto nas regiões afectadas ou em risco, como a nível internacional, salientando a necessidade de uma estratégia concertada local e mundial, no sentido de diminuir o impacto da doença nas populações e controlar globalmente a cólera.

A cólera – Microbiologia

O agente microbiológico da cólera, *Vibrio cholerae*, insere-se na família *Vibrionaceae*.^{2,4} Foi inicialmente descrito em 1854 na Itália por Pacini que o identificou como agente dos casos de cólera que atingiam Florença na época. Contudo, a noção de cólera como infecção por *Vibrio cholerae* surgiu apenas na sequência da redescoberta do vibrião por Koch (1883), no Egipto, durante uma epidemia de cólera.^{2,7}

O *Vibrio cholerae* é um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, oxidase positivo, não esporogénico, em forma de vírgula, com elevada mobilidade que lhe é

conferida por um flagelo polar.^{2,4} É uma espécie que está bem definida por testes bioquímicos e de biologia molecular.^{2,4}

São conhecidos mais de 200 serogrupos, que são classificados segundo o antígeno maior de superfície do *Vibrio cholerae* – o antígeno somático O.^{2,4,5} Apenas dois serogrupos, toxigénicos, têm potencial epidémico estabelecido – O1 e O139.

O serogrupo O1 tem sido associado a casos esporádicos, epidemias e pandemias de cólera e subdivide-se em 3 serotipos com base em diferenças quantitativas dos factores A, B e C do antígeno somático O – Inaba, Ogawa e Hikojima, sendo este último serotipo raramente isolado.^{2,4} Neste serogrupo distinguem-se ainda 2 biótipos – Clássico e El Tor – segundo as suas características fenotípicas.^{2,4,5} O biótipo clássico foi responsável pelas 5^a e 6^a pandemias de cólera e presumivelmente também pelas anteriores pandemias.^{2,3} A 7^a pandemia (1961 – presente) é atribuída ao biótipo El Tor.^{2,3}

Num estudo epidemiológico realizado durante a primeira epidemia de cólera El Tor na Nigéria, ambos os serotipos, Ogawa e Inaba, foram isolados ao longo de 7 anos. Nos primeiros 3 anos da epidemia apenas foi identificado o serotipo Ogawa e ambos os serotipos foram isolados no tempo remanescente.⁸

Foi demonstrado experimentalmente haver conversão entre os serotipos Ogawa e Inaba do serogrupo O1.² Ocorre habitualmente no sentido Ogawa – Inaba, sendo provavelmente devida à pressão selectiva exercida pela resposta imunitária anti – Ogawa no decurso da infecção.

O serogrupo O139 foi identificado em 1992 na Índia e no Bangladesh como uma estirpe epidémica emergente.^{2,4} A ausência de antígeno somático O1 e a presença de cápsula permitem distingui-lo do serogrupo O1.² Os estudos genéticos, sustentados por estudos de epidemiologia molecular, demonstraram que sua emergência resultou de recombinação genética, com transferência genética

horizontal de um fragmento de ADN de um serogrupo não O1 (possivelmente O22) para a estirpe O1 El Tor responsável pela 7ª pandemia.^{4,9,10} As características do *Vibrio cholerae* O139 tornam-no agente potencial de uma eventual 8ª pandemia.^{2,4} Os restantes serogrupos, sem potencial epidémico, são responsáveis por raros casos esporádicos de diarreia e infecções extra-intestinais, sobretudo em indivíduos imunossuprimidos ou com patologia hepática.^{2,4,5}

A cólera – Da patogénese ao quadro clínico

A cólera é uma doença mediada por uma potente toxina produzida pelo *Vibrio cholerae*.^{2,4} Os vibriões são ingeridos sob a forma de água e alimentos contaminados e progridem ao longo do tubo digestivo com vista à colonização do intestino delgado onde produzem a enterotoxina.

A 1ª barreira surge a nível gástrico e resulta das propriedades vibriocidas que o ácido clorídrico confere ao suco gástrico, o que condiciona a necessidade de inóculos elevados para garantir a infecção.² De facto, estudos experimentais em voluntários sãos demonstraram que são necessárias doses de 10^{11} vibriões para induzir diarreia.² Contudo, se co-administrados com NaHCO_3 , que neutraliza o suco gástrico, a dose infecciosa é significativamente menor (10^6).² Em condições naturais esta dose poderá ser ainda menor.^{2,4,5} Os alimentos podem desempenhar o mesmo papel que o NaHCO_3 e a muitos indivíduos poderão ter hipocloridria. Por outro lado, outros factores do hospedeiro ainda mal definidos podem determinar a susceptibilidade à doença. Por exemplo, sabe-se que indivíduos com grupo sanguíneo O têm maior susceptibilidade à forma grave de cólera embora o mecanismo subjacente seja ainda desconhecido.²

A 2ª barreira está relacionada com a camada que reveste o epitélio da mucosa intestinal. A mobilidade do vibrião e a presença de fímbrias permite-lhe ultrapassar esta camada de muco e aderir ao epitélio, possibilitando a sua colonização e criando as condições propícias à produção e secreção da enterotoxina.² Durante todo o processo a mucosa permanece intacta e sem alterações inflamatórias.² A enterotoxina, ao interferir nos mecanismos iónicos locais, promove a acumulação de fluido isotónico no lúmen intestinal, o que resulta em diarreia aquosa abundante quando a capacidade de absorção do intestino é ultrapassada.^{2,4,5} Esta perda de líquidos e electrólitos conduz a desidratação grave e choque hipovolémico, acidose metabólica por perda de bicarbonato, e depleção de potássio.^{2,4,5} As fezes dos doentes são muito infecciosas pela elevada concentração de vibriões presentes (até 10^8 vibriões / grama).²

O quadro clínico da doença e suas complicações é assim marcado pela desidratação secundária à diarreia. Após o período de incubação (variável entre 18 horas e 5 dias) surge um quadro agudo de diarreia aquosa que evolui para dejeções com características semelhantes a água de arroz e cujo o débito que pode rapidamente atingir 500–1000 ml/hora.^{2,4,5} Este quadro vai condicionar desidratação grave e rápida evolução para choque, acidose metabólica, insuficiência renal aguda e morte em menos de 24 horas na ausência de instituição atempada e eficaz de medidas de re-hidratação.^{2,4,5} As caimbras musculares dolorosas são frequentes e resultam das alterações iónicas.

Apenas uma minoria de pessoas infectadas desenvolve um quadro clínico grave ou muito grave.² A infecção por biótipo clássico é geralmente mais grave que a infecção pelo biótipo El Tor. Onze por cento dos indivíduos infectados pelo biótipo clássico desenvolvem cólera grave, contra 2% de indivíduos infectados pelo biótipo El Tor.² A forma ligeira ou moderada de doença não se distingue da gastroenterite e

a taxa de infecção assintomática é elevada (75% das infecções pelo biotipo El Tor e 59% das infecções pelo biotipo clássico).² Isso pode justificar a maior dispersão geográfica e área de endemicidade características da 7ª pandemia.² O quadro clínico provocado pelo serogrupo O139 é semelhante ao do serogrupo O1.

O tratamento fundamenta-se na re-hidratação.^{2,4,5} É orientado pelo grau de desidratação do doente e deve incluir a monitorização do débito de fezes. Deve ser iniciado imediatamente, mesmo não havendo diagnóstico etiológico.^{2,4,5} A re-hidratação é efectuada por via endovenosa nos casos graves, com lactato de Ringer. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda igualmente a instituição de hidratação oral assim que possível com a solução de re-hidratação oral (SRO).^{2,4,5} A instituição de antibioterapia é uma medida de 2ª linha com vista a encurtar a duração da doença e diminuir o débito da diarreia.^{2,4,5} A antibioterapia deve ter em conta o padrão de sensibilidade e resistência local do agente. A sua utilização profiláctica é desaconselhada pela baixa relação custo-eficácia e elevada indução de resistências.⁴ Os antibióticos presentemente recomendados pela OMS são as tetraciclinas, a eritromicina e as quinolonas.^{4,5}

A cólera – Diagnóstico

Diagnóstico Clínico

O quadro agudo de desidratação grave por diarreia que caracteriza a cólera, a sua elevada mortalidade e a rápida progressão dos surtos para epidemias explosivas e mesmo pandemia faz da cólera uma problemática de índole local e internacional. A emergência na intervenção e o potencial de disseminação geográfica levanta a necessidade de notificação da doença às autoridades de saúde nacionais e internacionais.⁴ Efectivamente, a cólera foi a 1ª doença de notificação obrigatória a nível mundial.

Apesar de definitivo, o diagnóstico microbiológico nem sempre é exequível. A OMS elaborou uma definição de caso suspeito de cólera com base na qual a doença deve ser notificada, mesmo na ausência de confirmação laboratorial.⁴ Segundo esta organização, deve-se suspeitar de um surto de cólera se um indivíduo de idade superior a 5 anos desenvolver um quadro de desidratação grave ou morrer na sequência de diarreia aquosa aguda, ou ainda, se houver um aumento súbito no número diário de doentes com diarreia aquosa aguda, especialmente doentes com fezes em água de arroz.⁴

Diagnóstico Microbiológico

Os casos suspeitos de cólera devem ser confirmados com o isolamento do agente nas fezes do doente – diagnóstico definitivo.^{2,4} O isolamento do agente é efectuado em meios bacteriológicos com produção de colónias características.^{2,11,12} O seu exame microscópico a fresco e com coloração de Gram mostra um bacilo móvel, curvo, Gram negativo e em que a reacção de oxidase é positiva – *Vibrio cholerae*. As colónias bacterianas são então submetidas à reacção de aglutinação com antisoro polivalente O1 e antisoro O139. A identificação do serogrupo, permite desencadear a notificação internacional, com diagnóstico presuntivo de cólera e envio para um laboratório de referência para confirmação. Este processo de isolamento demora cerca de 36 a 48 horas intra-laboratório.^{2,4,11,12}

Para obviar esta demora foram desenvolvidos testes rápidos baseados em anticorpos monoclonais dirigidos à enterotoxina ou ao lipopolissacárido do *Vibrio cholerae* O1 e O139.^{2,13,14} Podem ser aplicados directamente nas fezes com obtenção do resultado em alguns minutos e com excelente correlação com o método clássico de diagnóstico, tanto em meio laboratorial e como no terreno.^{13,14} As suas características de simplicidade e facilidade de execução, rapidez de

obtenção e fiabilidade do resultado, assim como a facilidade de transporte e acondicionamento tornam estes testes uma ferramenta com grande potencial de aplicabilidade em área endémica e surtos de epidemia, mesmo em áreas geográficas isoladas e/ou com recursos precários. Em área endémica pode também ser válido o exame microscópico a fresco das fezes, embora a especificidade e sensibilidade desta técnica seja muito dependente de quem a executa.²

Diagnóstico Serológico

A serologia da cólera tem interesse no diagnóstico retrospectivo de infecção, na sero-epidemiologia e na avaliação de eficácia de vacinação.^{2,11,12} São dois os testes serológicos principais: titulação de anticorpos anti-vibriocida (poder vibriocida) e titulação de anticorpos anti-toxina.^{2,11,12} A interpretação dos títulos de anticorpos diverge consoante o contexto epidemiológico: área endémica *versus* área não endémica em cólera.² (ver «A Cólera – Imunidade: aplicação à sero-epidemiologia e à vacinação»)

A cólera – Epidemiologia e ecologia

A introdução *de novo* do *Vibrio cholerae* numa área geográfica, formada por uma população maioritariamente não imune, origina uma epidemia caracterizada por incidência e morbi-mortalidade elevadas, atingindo homogeneamente todas as faixas etárias da população.^{2,4,5} Quando grande parte da população adquiriu imunidade à doença (população imune ou semi-imune) – área endémica – a cólera tende a atingir os chamados grupos vulneráveis: preferencialmente crianças dos 2 aos 9 anos de idade, mulheres em idade fértil (pela elevada exposição durante a assistência às crianças) e indivíduos idosos.^{2,5}

Em área endémica a cólera tende para uma distribuição sazonal variável consoante a área geográfica.^{2,4,5} A transmissão da doença é assegurada pelo consumo água e alimentos (especialmente frutos do mar) contaminados.^{2,4,5} A gravidade da infecção depende de vários factores como o inócuo bacteriano, a integridade da barreira ácida do estômago e grupo sanguíneo do hospedeiro e a imunidade adquirida do hospedeiro.^{2,4,5} A taxa de infecção assintomática, mais elevada no serogrupo El Tor, é importante na transmissão secundária, principalmente intra-familiar.^{2,4,5} Os indivíduos com infecção assintomática são geralmente identificados de entre os indivíduos que partilham a habitação com outro indivíduo com doença clínica.² Segundo alguns autores a transmissão da infecção entre os contactos familiares pode variar de 4 a 22% em média.⁵

O *Vibrio cholerae* integra a flora bacteriana autóctone das águas de zonas costeiras, estuários e rios.^{2,4,7} Numerosos estudos detectaram estirpes O1 e não O1 em zonas costeiras e ribeirinhas a nível mundial, como parte integrante dos ecossistemas locais.⁷

Apesar da ubiquidade do *Vibrio cholerae*, a cólera só é endémica em determinadas regiões do mundo (sobretudo tropicais e subtropicais), o que, segundo alguns autores, está provavelmente relacionado com factores ambientais e sócio-económicos.⁷ Em áreas endémicas a cólera tende para um padrão sazonal que se pensa estar relacionado com a ecologia do *Vibrio cholerae* no ecossistema, correspondendo ao aumento da temperatura das águas e densidade do zooplâncton, com o qual estabelece uma relação simbiótica.⁷

O isolamento de estirpes O1 e O139 no ambiente é difícil, mesmo em áreas endémicas, sobretudo em período interepidémico.^{2,7} Em contrapartida, as estirpes não O1, caracterizadas por maior capacidade de sobrevivência e resistência aos detergentes e agentes quelantes, são facilmente detectadas.⁷ A evolução na

epidemiologia molecular e o estudo do genoma do vibrião indicam que as estirpes toxigênicas (O1 e O139) podem emergir de estirpes não toxigênicas existentes no ambiente por recombinação genética.^{4,7} Este facto, já confirmado laboratorialmente, veio alertar para a importância da monitorização dos serogrupos não O1 no ambiente, em paralelo com a do serogrupo O1.⁷

Por outro lado, em condições adversas, o *Vibrio cholerae* tem a capacidade de assegurar a sua sobrevivência, podendo permanecer viável no ambiente durante vários anos.² Isto constitui uma vantagem adaptativa e evolutiva e pode determinar o seu sucesso como agente patogénico.⁷ Pode entrar em estado dormente (estado viável não cultivável), ou assumir uma forma rugosa, que lhe confere resistência a desinfetantes (incluindo o cloro, que é o habitualmente utilizado).^{2,4,7}

Factores como a temperatura, a salinidade, a luz solar, o grau de pH e o ião ferro interferem na proliferação do vibrião assim como na sua seroconversão e virulência.^{3,5,7} O *Vibrio cholerae* prolifera em ambientes de águas estagnadas, com temperaturas variando entre os 10 e 30 °C e salinidade elevada (permilagem entre 5 a 30). A sua sobrevivência é também promovida pela associação ao fitoplâncton e ao zooplâncton em interacção dinâmica e sinérgica.⁷ A bactéria adere à camada de quitina e coloniza o tubo digestivo dos crustáceos constituintes do zooplâncton, estabelecendo-se uma relação simbiótica entre ambos. As alterações climáticas e sazonais, assim como condicionantes humanas de densidade populacional / demografia, higiene sanitária e condições sócio-económicas interferem neste modelo dinâmico de doença.⁷

A transmissão ao ser humano é realizada através da água de consumo humano ou de alimentos e a doença é dose-dependente.⁷ A associação do vibrião aos constituintes quitinosos do zooplâncton permite a obtenção fácil do inócuo infeccioso e protege o vibrião da acidez gástrica.⁷ A epidemia pode então ser

desencadeada por transmissão secundária. Com base nestas descobertas, no Bangladesh, o simples acto de filtrar a água antes de a consumir por meio de um sari permitiu a redução do risco de infecção em 50%.⁷

O avanço no conhecimento da ecologia do *Vibrio cholerae* veio revolucionar o conceito epidemiológico da cólera como doença de transmissão fecal – oral, no sentido de um modelo de interacção dinâmica e complexa de uma multiplicidade de factores, em que a influência do ambiente tem um papel primordial. Introduziu o conceito do ambiente como reservatório (ante a ubiquidade da bactéria em meios aquáticos, a sua capacidade de adaptação às adversidades e a sua associação ao plâncton) e tornou obsoleto e utópico o conceito de erradicação do *Vibrio cholerae*.^{4,7} Isto implica a reorientação da estratégia de intervenção no sentido do controlo da doença. Se a isso associarmos as modificações climáticas globais que progressivamente se desenvolvem e que poderão contribuir para a difusão geográfica da bactéria e interferir na dinâmica da doença, é urgente um grande investimento nos sistemas de saúde pública e de saneamento básico, que permitirão uma sã convivência das populações com o vibrião.⁷

A Cólera – Imunidade: aplicação à sero-epidemiologia e à vacinação

A infecção por *Vibrio cholerae* confere imunidade protectora e o seu impacto reflecte a imunidade da população.

Em contexto de epidemia, a cólera atinge indivíduos de todas as faixas etárias. Em área endémica, pelo contrário, a doença tende a atingir os extremos etários. Esta discrepância, confirmada em estudos epidemiológicos em área endémica, permitiu demonstrar o papel da imunidade adquirida na sequência de infecção natural por cólera, que foi inicialmente sugerida por Burnet em 1962.^{2,15} Posteriormente, estudos realizados em voluntários experimentalmente infectados com *Vibrio*

cholerae O1 (biotipo clássico) mostraram 100% de protecção contra a re-infecção por *Vibrio cholerae* O1 (biotipo clássico).^{2,16}

A protecção conferida pela infecção inicial por *Vibrio cholerae* O1 (biotipo clássico) foi documentada experimentalmente por um período máximo estudado de 3 anos, havendo imunidade cruzada protectora entre os serotipos (Ogawa e Inaba).^{2,16} Os estudos realizados com o biótipo El Tor em área endémica também foram demonstrativos da imunidade protectora conferida pela cólera. A infecção por cólera clinicamente grave originou uma seroconversão de 90% dos indivíduos associada a redução do risco de reinfecção.¹⁷ Contudo, mais recentemente um estudo salientou que, se à infecção inicial pelo biótipo clássico se associava uma imunidade protectora completa, a imunidade protectora conferida pelo biótipo El Tor era menos significativa.² No homem, a imunidade cruzada entre os biótipos (Clássico e El Tor) nunca foi investigada com estirpes virulentas.² Presentemente, ambos os biótipos coexistem apenas no Bangladesh, e nas restantes áreas atingidas pelo *Vibrio cholerae* O1, apenas o biótipo El Tor tem sido identificado.

A infecção por *Vibrio cholerae* induz uma resposta imunitária humoral a nível da mucosa intestinal e a nível sistémico, que é dirigida contra os componentes bacterianos somáticos e contra a enterotoxina.¹⁸ Vários estudos foram desenvolvidos no sentido de avaliar a imunogenicidade, a nível intestinal e sistémico, decorrente de infecção natural e da vacinação, no sentido de estabelecer a correlação entre ambas as respostas imunitárias e determinar os anticorpos protectores contra a cólera.^{19,20,21,21,22,23,24,25} Mais recentemente, foi confirmada a existência de memória imunológica intestinal, já sugerida em estudos anteriores. Apesar de inicialmente se admitir ser a resposta imunitária ao *Vibrio cholerae* eminentemente humoral, a presença de imunidade celular associada a memória

imunológica na sequência da imunização oral contra a cólera foi demonstrada experimentalmente.^{26,27}

O facto de o *Vibrio cholerae* ser um agente patogénico não invasivo alertou para o papel da mucosa intestinal na resposta imunitária à cólera.^{1,2} Assim, a imunidade protectora é atribuída aos anticorpos produzidos localmente na mucosa intestinal e secretados para a superfície da mucosa. Estes anticorpos, dirigidos contra os antígenos somáticos e contra a enterotoxina, actuam inibindo a adesão, colonização e multiplicação bacterianas a nível intestinal.¹⁸ Foram identificadas imunoglobulinas A, M e G no lúmen intestinal.¹ As imunoglobulinas A intestinais secretórias são considerados os verdadeiros mediadores da imunidade protectora.^{1,2} No entanto, e apesar de toda a investigação realizada, a natureza e características da imunidade protectora ainda não está completamente esclarecida.

Paralelamente, na sequência de infecção por *Vibrio cholerae*, a nível sistémico, surgem anticorpos dirigidos contra o corpo bacteriano (somáticos) e contra a enterotoxina.^{1,2,18} Os anticorpos vibriocidas salientam-se de entre a imunidade antibacteriana, consistindo na resposta imunitária sérica induzida pela infecção por *Vibrio cholerae* que se encontra melhor caracterizada.^{1,2} Estes anticorpos têm a capacidade de provocar a lise do *Vibrio cholerae* em presença do complemento (poder vibriocida do soro). São maioritariamente dirigidos ao lipopolissacarido (LPS) do vibrião, podendo contudo ter actividade sobre outras proteínas somáticas ainda não identificadas. São sobretudo imunoglobulinas de tipo M. A correlação entre o poder vibriocida e a protecção contra a cólera está consistentemente estabelecida e documentada em vários estudos epidemiológicos e experimentais.^{15,17,20,27,28,29,30}

Os anticorpos vibriocida não são os mediadores da imunidade adquirida protectora na cólera, mas servem de marcador para a presença de imunoglobulinas de tipo A secretórias intestinais, que são consideradas as mediadoras primárias da imunidade

protectora.^{1,2} Relativamente à resposta imunitária à enterotoxina, os estudos epidemiológicos não mostraram correlação entre os anticorpos antitoxina e a protecção contra a cólera.^{2,17}

Os estudos em voluntários sãos e em cenários de epidemia (sem exposição prévia à doença ou vacinação)^{16,20} mostraram que os anticorpos vibriocida aumentam rapidamente na sequência da infecção. Atingem um pico 8 a 10 dias após o início de doença clínica e regressam aos valores basais ao fim de 2 a 7 meses. Os anticorpos antitoxina persistem até 2 anos. Numa epidemia, a maioria dos indivíduos infectados desenvolve doença clínica.

No entanto, em cenários de endemia, como foi demonstrado em estudos sero-epidemiológicos, os anticorpos vibriocida são adquiridos precocemente e persistem elevados devido à exposição mantida ao *Vibrio cholerae*, dado que o agente se mantém em circulação na população em período inter-epidémico.^{2,15,28,30} São detectados em 40 a 80% dos indivíduos com 15 anos de idade. O aumento da imunidade vibriocida com a idade está inversamente relacionada com a incidência de cólera na população, havendo, no entanto, um decréscimo da imunidade nos indivíduos idosos.^{15,28} Nos adultos, a infecção é frequentemente assintomática ou clinicamente pouco significativa, o que pode ser explicado pela imunidade adquirida (sub)total.

No Paquistão, durante a 6^a pandemia (*V. cholerae* O1 biotipo clássico), foi demonstrada uma redução de 44% na taxa de incidência por duplicação do título vibriocida (média geométrica) na população.²⁸ Os casos de cólera são significativamente mais frequentes em indivíduos com títulos vibriocida <20 (*V. cholerae* O1 biotipo El Tor e clássico), podendo a titulação de anticorpos vibriocida servir de indicador da susceptibilidade à doença.^{2,15,28} Os surtos epidémicos tendem a verificar-se em populações virgens ou em zonas endémica quando a

seroprevalência diminui.^{2,15,28} A utilização de antibióticos não interfere no poder vibriocida.

Em conclusão, a valorização dos estudos serológicos depende do contexto em que são realizados. Em área não endêmica, o poder vibriocida do soro permite um diagnóstico retrospectivo da infecção/doença e uma avaliação da evolução imunitária do indivíduo em resposta à doença.² Em área endêmica, reflecte a imunidade da população, podendo ser utilizado como indicador de endemicidade e de susceptibilidade à cólera.^{30,31}

Os anticorpos antitoxina têm pouco interesse na avaliação serológica em área endêmica em termos de rastreio populacional devido à exposição cumulativa da população ao vibrião e à existência de reacção cruzada entre a enterotoxina e outras toxinas bacterianas, nomeadamente à da *Escherichia coli* enterotoxigénica.¹⁷ Os aumentos nestes anticorpos são mais sensíveis na identificação de indivíduos recentemente doentes.¹⁷

Entre os serogrupos (O1 e O139) do *Vibrio cholerae*, não existe imunidade cruzada.² Tanto na infecção pelo serogrupo O1 e como na infecção pelo serogrupo O139 do *Vibrio cholerae* há indução de resposta humoral antibacteriana de tipo IgA e IgM. Essa resposta é demonstrativa de resposta imunológica a nível da mucosa e é selectiva do serogrupo infectante.^{2,23}

A investigação e progressivo conhecimento da resposta imunitária à cólera têm contribuído reciprocamente para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos serológicos com vista à sua aplicação prática na avaliação da eficácia das vacinações e ao diagnóstico de doença, bem como em estudos epidemiológicos.^{17,32,33,34,35,36,37,38,39} Contudo, em termos práticos, os métodos mais estudados e que se mantêm como referência são o poder vibriocida e o doseamento de anticorpos antitoxina.^{2,11,12}

Em termos sero-epidemiológicos, o rastreio populacional através do doseamento de anticorpos vibriocida em áreas endémicas permite a análise retrospectiva da infecção e, ao estar correlacionado com a protecção contra a cólera, serve de indicador da susceptibilidade à doença. Por isso, a monitorização serológica da cólera por este meio pode também ter interesse e ser utilizada como ferramenta na vigilância epidemiológica da doença em áreas endémicas.^{29,31}

A Cólera – Estratégias de prevenção e combate

A estratégia de prevenção e controlo das epidemias de cólera, preconizada pela OMS, consiste em:^{5,40,41}

- Medidas de prevenção, a curto e longo prazo, que implicam o aprovisionamento de água potável e sua distribuição à população, vigilância microbiológica da água, construção de infra-estruturas de saneamento básico e de controlo de resíduos sólidos.
- Preparação e resposta de emergência à epidemia, que se fundamenta na detecção precoce de epidemia com base num sistema de vigilância epidemiológica e detecção activa de casos e contactos. Preconiza a constituição dos Centros de Tratamento de Cólera. Deve assegurar a acessibilidade das populações aos cuidados de saúde, o que pode passar pela criação de unidades de saúde móveis e hospitais de campanha nas áreas mais remotas.
- Manuseamento adequado dos casos através da instituição imediata de medidas de re-hidratação.
- Programa de educação para a saúde focalizado nas medidas higieno-sanitárias básicas individuais, no manuseamento adequado da água e nos cuidados na preparação dos alimentos.

O objectivo do controlo efectivo da cólera é diminuir a taxa de letalidade por cólera para menos de 1%.¹ Em 1997 a taxa de letalidade global foi de 4.3% e em 2003 de 1.7%.⁴² O número de casos de cólera a nível mundial permanece muito elevado e a emergência de uma nova estirpe (O139) é causa de grande apreensão.

Entretanto, a área de endemicidade da cólera tem vindo a aumentar. Em muitas regiões as condições sanitárias são precárias e não tendem a melhorar a curto prazo. A isso acrescem as catástrofes naturais, as alterações climáticas, a instabilidade política e os fluxos migratórios populacionais, que potenciam a falência das infra-estruturas sócio-económicas e dificultam o controlo da doença.^{1,43,44,45} Neste contexto, emerge o recurso à imunização oral como medida complementar na estratégia de prevenção e controlo da cólera.^{1,43,44,45}

A vacinação oral contra a cólera é conhecida desde 1980 e actualmente estão disponíveis 2 vacinas orais dirigidas ao serogrupo O1 com segurança e imunogenicidade demonstradas: inactivada (WC/rBS) e viva atenuada (CVD 103-HgR).^{1,2,41,43,44}

A vacina oral inactivada resulta da combinação de células de *Vibrio cholerae* O1 mortas (10^{11} células), de ambos os serotipos e biótipos, com 1 mg de subunidade B purificada da enterotoxina (WC/BS).^{2,41,43,44} Os ensaios desenvolvidos em meio laboratorial e no terreno, em área endémica, demonstraram a sua eficácia e ausência de efeitos secundários significativos. De entre estes destaca-se o ensaio desenvolvido no Bangladesh com *follow up* de 5 anos, em que a vacina foi testada em crianças entre os 2 e os 15 anos e em adultos.^{37,38,39,46} Constatou-se 82-87% de eficácia protectora até aos 6 meses em todos os indivíduos vacinados. Aos 3 anos de *follow up*, no global, mantinha uma eficácia protectora moderada (cerca de 60%). Nos indivíduos com idade inferior a 5 anos, a eficácia protectora diminuiu rapidamente após os primeiros 6 meses de *follow up* e era praticamente inexistente

ao fim de 3 anos. A vacinação conferiu igualmente protecção de curta duração contra a *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC): 67% aos 3 meses.^{47,48}

A composição da vacina foi modificada: a subunidade B passou a ser obtida por recombinação genética, conseguindo-se assim uma formulação menos dispendiosa (WC/rBS), mantendo a eficácia e imunogenicidade da sua análoga (demonstrado em ensaios em voluntários de área endémica e de área não endémica).^{2,41,43,44,49} Comercializada sob a denominação de Dukoral®, é administrada em 2 doses com 8 dias de intervalo entre elas, sendo eficaz 7 dias após a 2ª dose. A sua segurança e imunogenicidade foram também demonstradas em indivíduos com infecção VIH (vírus da imunodeficiência humana).^{41,50,51}

De entre as vacinas orais vivas atenuadas produzidas, salienta-se a CVD 103-HgR, denominada de Orochol®, baseada numa estirpe geneticamente manipulada de *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR, administrada numa só dose.^{1,2,41,43,44} Os ensaios em voluntários demonstraram uma eficácia protectora de 95% para o biótipo clássico e de 65% para o biótipo El Tor, serotipos Ogawa e Inaba.^{1,2,36,41,52} Outro estudo realizado em área endémica (Indonésia) não demonstrou eficácia protectora convincente.^{41,43,44} A sua segurança e imunogenicidade em indivíduos com infecção VIH (vírus da imunodeficiência humana) foram também documentadas, embora existam poucos estudos a abordar a eficácia e segurança das vacinas orais neste contexto.^{41,53}

Ainda em fase experimental, mais ou menos avançada, encontram-se várias vacinas dirigidas a ambos os serogrupos (O1 e O139) individualmente e/ou combinadas, orais e injectáveis.^{24,43,44,54} O contexto actual torna urgente a disponibilização de vacinas eficazes dirigidas a ambos os serogrupos toxigénicos do *Vibrio cholerae*.^{1,41}

Entre 1997 e 2000, as vacinas orais contra a cólera foram utilizadas com sucesso em campanhas de vacinação em massa, como medida complementar à estratégia

tradicional de controlo da doença.⁴¹ No Uganda, em 1997, a vacina WC/rBS foi administrada num campo de refugiados no Uganda, numa população de 44000 indivíduos, como estratégia de prevenção.⁵⁵ Em 2000, nos Estados Federados da Micronésia e República das Ilhas Marshall, foi utilizada a vacina CVD 103-HgR em campanha de vacinação em massa após instalação da epidemia (estratégia reactiva).⁴⁵

De acordo com a OMS, o recurso à vacinação oral contra a cólera (campanhas de vacinação em massa) é recomendado em circunstâncias endémicas e epidémicas específicas, mas ainda mal definidas, como medida complementar à estratégia clássica de prevenção e controlo da doença.^{1,41} A vacinação de populações em risco elevado de epidemia em situações de emergência (campos de refugiados, bairros de lata, zonas endémicas com surtos epidémicos recorrentes, etc) deve ser efectuada antes da instalação do surto epidémico (6 meses) e nunca durante a epidemia.^{1,41,43,44} A OMS recomenda a vacina oral inactivada (WC/rBS) em situação de risco epidémico, dado que a sua eficácia está bem estabelecida em ensaios de campo. Quando a administração correcta da vacina (2 doses) seja logisticamente complicada poder-se-á recorrer à vacina viva atenuada (1 dose).^{1,41}

A Cólera – Análise da situação no Continente Africano

Desde a sua introdução no continente africano em 1970 na Guiné, no âmbito da 7ª pandemia atribuída ao serogrupo El Tor, a cólera difundiu-se rapidamente, minando diversos países africanos.^{1,2} Apesar da tendência global para a redução progressiva dos casos de cólera e sua letalidade, o número de casos mantém-se elevado, contribuindo o continente africano em larga medida para o impacto da cólera a nível mundial.¹ Em 2001, 173359 casos de cólera (taxa de letalidade 0.22 – 13.43%) foram notificados oficialmente no continente africano, à OMS, representando 94%

dos casos notificados a nível mundial.⁵⁶ Este cenário contrasta com a situação na Ásia e na América Latina, onde se tem registado uma tendência consistente para a redução progressiva da cólera, sendo o número de casos notificados anualmente significativamente inferiores (535 casos na América Latina e 10340 casos na Ásia em 2001).⁵⁶

Nos países atingidos pela doença a subnotificação dos casos é uma realidade, devido ao receio de sanções económicas e comerciais, de restrições às viagens e ao turismo, e também devido a limitações dos sistemas de notificação e vigilância epidemiológica. Deste modo, os casos de cólera notificados podem não reflectir o impacto global da doença, estimando-se existir, de um modo geral, um número de casos de cólera superior ao notificado.⁵⁶ De um modo geral, o sistema de vigilância epidemiológica é inexistente ou pouco eficaz.

Apesar do impacto da doença no continente africano, pouco se conhece sobre a cólera nos países africanos. Os estudos epidemiológicos realizados centram-se sobretudo na descrição de epidemias e seu manuseamento prático em campos de refugiados ou após catástrofes naturais, no âmbito de intervenções humanitárias.^{57,58,59,60,61,62} Nos surtos epidémicos de cólera no continente africano foram isolados: *Vibrio cholerae* O1 El Tor serotipo Inaba (Malawi 1988) e *Vibrio cholerae* O1 El Tor serotipo Ogawa (Uganda 1997 e Djibouti 2000).^{58,60,61}

A Cólera – Análise da situação em Moçambique e na Cidade da Beira (capital da Província de Sofala)

Relativamente à Cólera, Moçambique é considerada uma área de endemo-epidemicidade.⁵⁶ De um modo geral, registam-se casos de cólera ao longo de todo o ano a que se associam surtos epidémicos intermitentes nas diversas regiões do país. Os casos de cólera são geralmente detectados na sequência da estação das

chuvas, de Janeiro a Junho. As cidades de Maputo e da Beira são habitualmente as cidades mais afectadas.⁴⁰

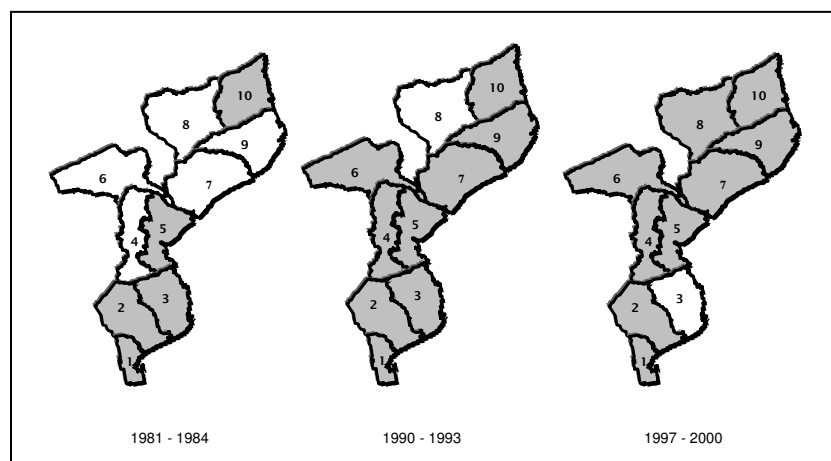


Figura 1 – Distribuição geográfica da cólera em Moçambique por província (1: Maputo, 2: Gaza, 3: Inhambane, 4: Manica, 5: Sofala, 6: Tete, 7: Zambézia, 8: Niassa, 9: Nampula, 10: Cabo Delgado).

Entre 1981 e 2001 registaram-se em Moçambique 3 surtos epidémicos interpolados por períodos de 2 a 4 anos em que não foram notificados casos de cólera (Figura 1 e Gráfico 1). De forma global, de 1981 a 2001, assim como ao longo de cada surto epidémico, verifica-se uma diminuição consistente da taxa de letalidade da cólera. A nível nacional, a resposta às epidemias de cólera é reactiva: fundamenta-se numa intervenção organizada de emergência que, embora diminua a mortalidade pela doença, não previne os casos de cólera. A evolução da taxa de letalidade reflecte a eficácia desta estratégia de intervenção sobre a mortalidade associada à doença.

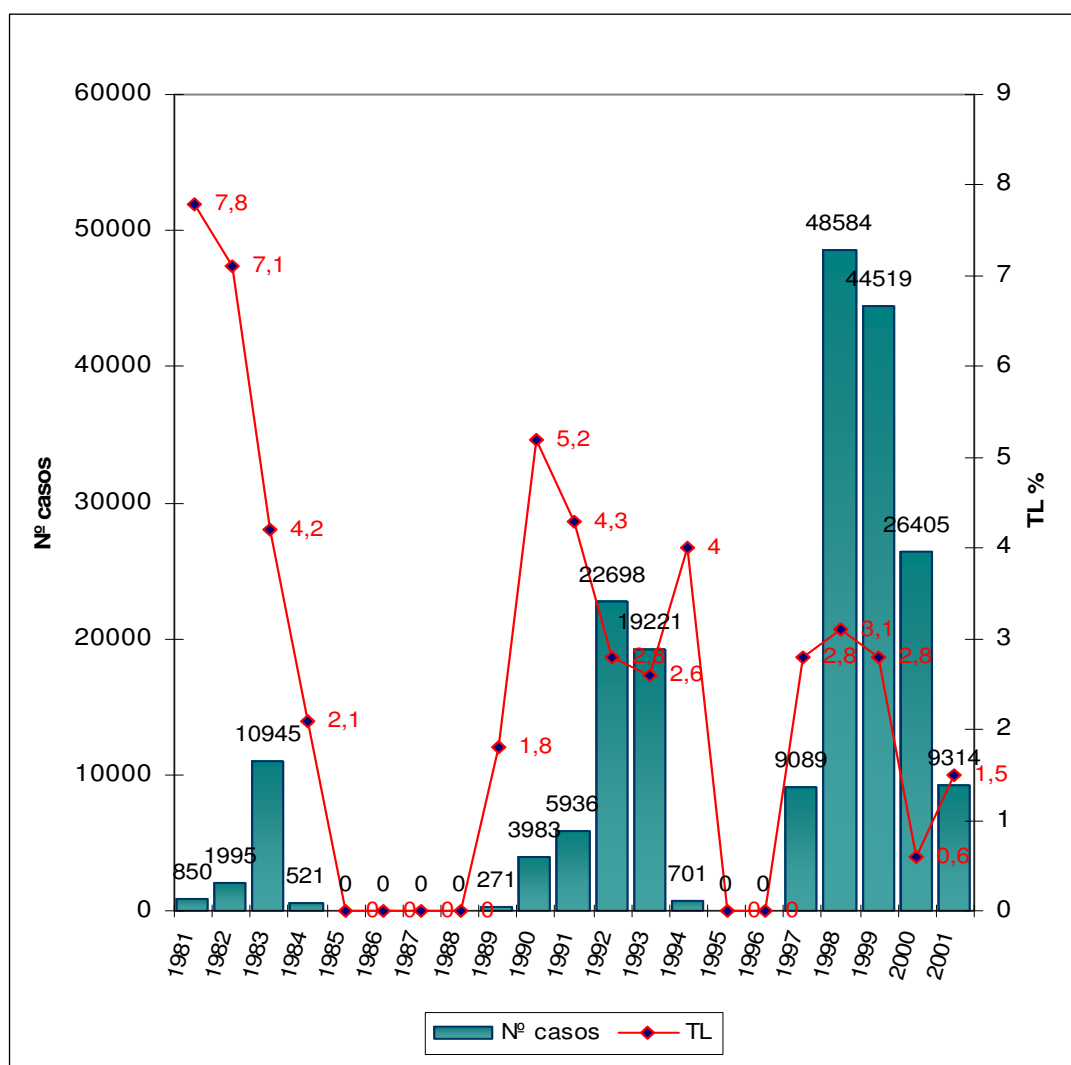


Gráfico 1 - Evolução da cólera (Número de casos notificados e Taxa de letalidade TL) em Moçambique 1981 - 2001 (N=205.032 casos)

O último surto epidémico teve início em Agosto de 1997 na cidade de Maputo.^{42,56,63,64,65} Estendeu-se posteriormente às restantes províncias, nomeadamente Maputo, Gaza, Manica e Sofala, que concentraram a maioria dos casos declarados. De acordo com os dados da OMS, nos primeiros 17 meses, foram oficialmente notificados 34.621 casos (985 mortes, taxa de letalidade de 2,85%). Os dados apurados em Moçambique apontam contudo para valores mais elevados (Gráfico 1). Na cidade da Beira (Província de Sofala) os primeiros casos registaram-se na última semana de Janeiro de 1998 (1.657 casos, taxa de ataque 4,1%).⁶⁵

A cidade da Beira, considerada endémica em cólera, é a segunda maior cidade de Moçambique e tem uma população estimada em cerca de 500.000 habitantes. Está localizada na zona costeira do centro do país, numa região pantanosa na foz do rio Pungwe, que está sujeita a cheias periódicas. A cidade está essencialmente organizada em bairros com condições precárias de habitabilidade e elevada densidade populacional. É nestes bairros, onde o meio urbano se mistura com o meio rural, que reside a maioria da população. A luz eléctrica está presente numa minoria de habitações; há grande dificuldade no acesso a água potável, sendo a água de consumo humano maioritariamente proveniente de poços não controlados. As estruturas de saneamento básico são praticamente inexistentes. De um modo geral, as latrinas são pouco utilizadas e frequentemente não são seladas. A defecação ao ar livre é prática habitual. Há uma gestão deficiente das águas residuais: a sua drenagem não é efectuada nas condições adequadas, acabando por se acumular à superfície e por se misturar com os lençóis de água. O nível de pobreza da população e a elevada taxa de analfabetismo contribuem para a degradação das condições, pela provável relação com inúmeras práticas diárias que podem perigar a saúde individual e colectiva.⁶³ O nível de pobreza da população pode condicionar igualmente os fluxos migratórios frequentes e temporários (na província e entre províncias) que caracterizam esta população.

De 1990 a 2002 foram notificados 36.953 casos de cólera na Cidade da Beira. 84% dos casos foram notificados desde 1998, data de início do último surto epidémico que teve elevado impacto em termos populacionais (Gráfico 2, Quadro 1). No 1º ano registaram-se 14.407 casos (Taxa de incidência 3,5%, Taxa de letalidade 2%), havendo uma redução abrupta do 1º para o 2º ano. A taxa de letalidade diminuiu progressivamente, à semelhança do observado a nível nacional, apesar do número de casos notificados mostrar uma tendência crescente a partir de 1999.

Na Cidade da Beira existe o Centro de Tratamento de Cólera. Este centro desempenha um papel central na vigilância epidemiológica da cólera apesar das limitações técnicas, de recursos humanos, materiais e logísticas existentes. Funciona como centro de referência de doentes com diarreia aguda não sanguinolenta, detectando quase todos os casos de diarreia aguda não sanguinolenta da cidade. O diagnóstico de cólera é clínico (diarreia aguda não sanguinolenta com evolução para desidratação grave e fezes em água de arroz). O diagnóstico microbiológico não é efectuado de forma sistemática e os testes serológicos não são realizados.

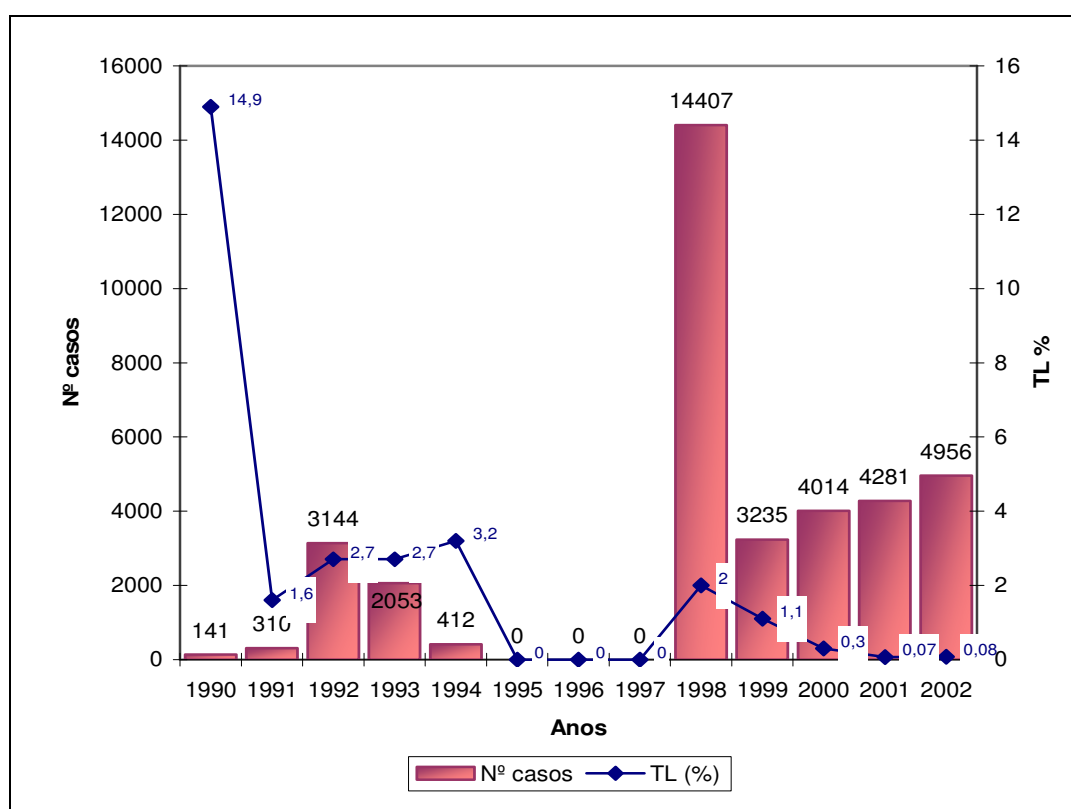


Gráfico 2 - Evolução da cólera (Número de casos notificados e Taxa de letalidade TL) na Cidade da Beira, Moçambique 1990 - 2002 (N= 36.953 casos)

Cólera na Cidade da Beira, Moçambique

	Casos (nº)	Óbitos (nº)	Taxa incidência (%)	Taxa letalidade (%)
1998	14.407	293	3,50	2,00
1999	3.235	37	0,70	1,10
2000	4.014	13	0,80	0,30
2001	4.281	3	0,80	0,07
2002	4.956	4	0,90	0,08
Total	30.893	350	–	–

Quadro 1 – Casos de cólera notificados na Cidade da Beira, Moçambique, entre 1998 – 2002. O nº de casos refere-se apenas a 10 meses do ano 2000 e a 7 meses do ano 2002.

Desde 1998 registam-se casos de cólera de forma uniforme ao longo de todo o ano, aumentando a incidência de Janeiro a Junho de cada ano (Gráfico 3).

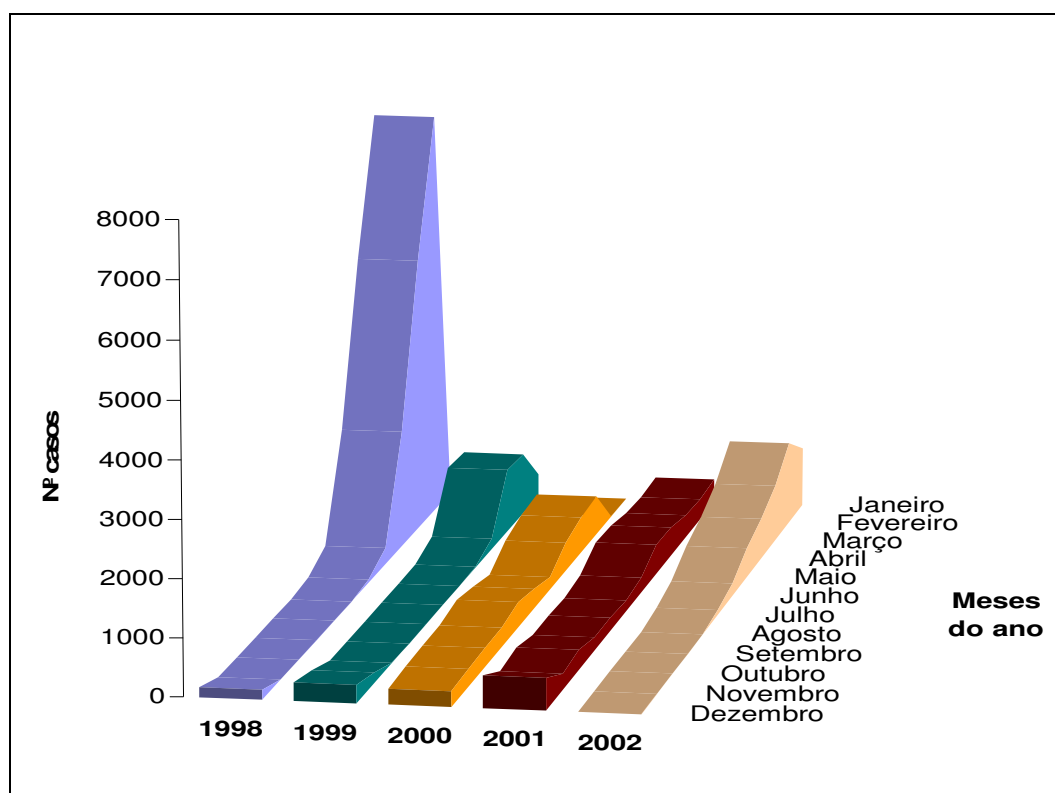


Gráfico 3 – Distribuição dos casos de cólera ao longo dos meses do ano, de 1998 a 2002, na Cidade da Beira, Moçambique. No ano 2000, a distribuição refere-se apenas de Março a Dezembro e, no ano 2002, refere-se apenas de Janeiro a Julho.

De 2000 a 2002, foram notificados 13.241 casos de cólera na Cidade da Beira, com taxa de incidência anual estável (0,8 – 0,9%) (Quadro 1). Cinquenta e sete por cento dos casos de cólera registaram-se no sexo masculino (Gráfico 4). Os indivíduos na faixa etária igual ou superior a 15 anos foram particularmente afectados ao longo dos 3 anos (58% dos casos em 2000, 50% dos casos em 2001, 38% dos casos em 2002) (Gráfico 5). Estes achados parecem estar em desacordo com os dados obtidos de forma consistente em estudos epidemiológicos em áreas endémicas que identificam as crianças como a sub-população mais afectada pela cólera.^{2,5}

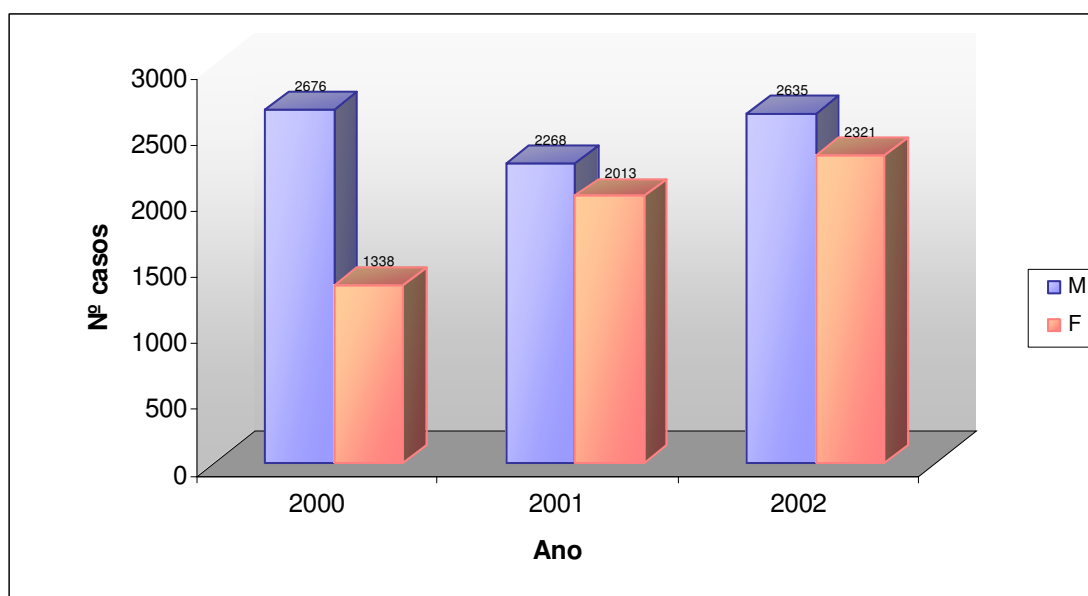


Gráfico 4 – Número de casos de cólera na Cidade da Beira, Moçambique, segundo o género (masculino M, feminino F) entre 2000 e 2002. Número total de casos em 2000 – 4014, número total de casos em 2001 – 4281, número total de casos em 2002 – 4956.

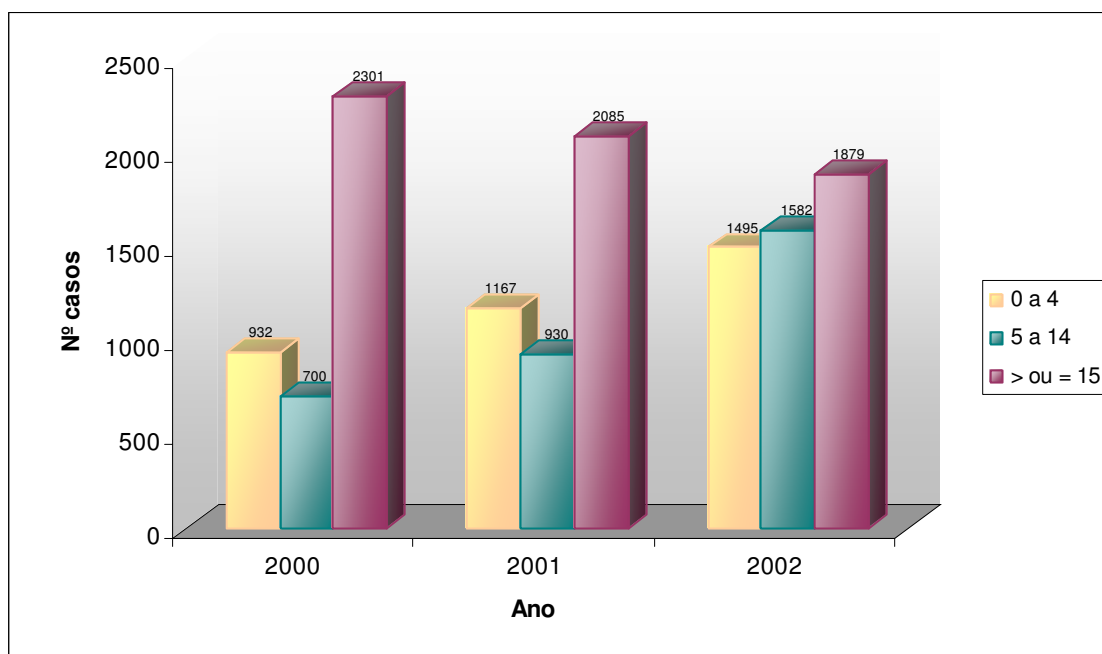


Gráfico 5 – Número de casos de cólera na Cidade da Beira, Moçambique, segundo a faixa etária (0 a 4 anos, 5 a 14 anos, igual ou superior a 15 anos) entre 2000 e 2002. Número total de casos em 2000 – 3933, número total de casos em 2001 – 4182, número total de casos em 2002 – 4956. Não foram considerados 81 indivíduos em 2000 e 99 indivíduos em 2001 por se desconhecer a faixa etária respectiva.

Para além da cólera, na cidade da Beira, existem outros problemas importantes de saúde pública como é o caso da malária, tuberculose e da infecção VIH/SIDA. O programa de vigilância sentinela para a infecção VIH entre mulheres grávidas detectou uma taxa de seropositividade entre 20 a 30 %.^{66*}

* NOTA: Os dados referentes à cólera em Moçambique e na Cidade da Beira apresentados foram obtidos de um estudo retrospectivo descritivo com base no registo de notificação oficial de cólera efectuado em 2003 na Cidade da Beira, pelo Departamento Universitário de Saúde Pública da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa (estudo não publicado).

FINALIDADE

- Contribuir para a monitorização epidemiológica da cólera na Cidade da Beira – Moçambique.

OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a seroprevalência de Cólera numa população adulta na Cidade da Beira – Moçambique.
- Determinar a estirpe circulante

MATERIAIS E MÉTODOS

Tipo de estudo

- Estudo descritivo transversal com base na comunidade

Local do estudo

- Cidade da Beira, República Democrática de Moçambique
- Centros de Saúde de Ponta Gea e Munhava

População – alvo

- População adulta, de idade igual ou superior a 15 anos, residente na Cidade da Beira, estimada em 318.973 indivíduos.**

Amostra

- Selecção da amostra efectuada nos Centros de Saúde de Munhava e Ponta Gêa, cidade da Beira, de entre os indivíduos que recorreram espontaneamente ao Gabinete de aconselhamento e teste voluntário para o VIH (vírus da imunodeficiência humana), durante o mês de Novembro de 2003 (período inter-epidémico de cólera).
- Amostra aleatória simples de 136 indivíduos de ambos os sexos (de conveniência), correspondente a 0.04% da população alvo.

** A cidade da Beira tem uma população total estimada em 2002 de 527.261 indivíduos, sendo a população adulta (idade igual ou superior a 15 anos) estimada em 308.321 (2002) e 318.973 (2003) (cálculos efectuados com base na taxa de crescimento anual da população).

- Critérios de inclusão: ter idade igual ou superior a 15 anos, residir na Cidade da Beira, dar consentimento informado para o estudo.
- Critérios de exclusão: ter sido vacinado contra a cólera

Variáveis e sua operacionalização

Variável	Operacionalização
Sexo	Feminino (F); Masculino (M)
Idade	Em anos completos de vida
Ocupação profissional	Ocupação profissional de acordo com a denominação local
Vacinado contra a cólera	Sim; Não
Título de anticorpo Vibriocida O1 (Inaba, Ogawa)	1/20 – 1/40960
Anticorpo Vibriocida O1 (Inaba, Ogawa)	Negativo – título < 1/20 Positivo – título ≥ 1/20

Descrição metodológica

Durante o mês de Novembro de 2003, procedeu-se à selecção da amostra e colheita de dados nos Centros de Saúde de Ponta Gêa e de Munhava, na Cidade da Beira – Moçambique. A cada indivíduo da amostra foi efectuada uma colheita de 3 a 5cc de sangue venoso periférico por um enfermeiro local, em paralelo com a recolha dos dados de identificação. Cada amostra de sangue foi submetida a centrifugação automática, seguida de extracção do soro para aliquots com tampa de rosca. As amostras de soro foram conservadas a -20°C.

Para o doseamento serológico foi seleccionado o método simplificado em microplacas para detecção de anticorpos vibriocida para *Vibrio cholerae* O1, descrita por Dodin e Fournier (1992) e Bougoudogo et al (1995) e posteriormente modificada por Boutonnier et al (2003). Trata-se de uma técnica simples que permite testar vários soros em simultâneo e obter resultados em menos de 72 horas. Os materiais necessários e a simplicidade das condições de aplicação permitem a sua realização mesmo em laboratórios de bacteriologia básicos ou pouco apetrechados, como os que existem em muitas regiões onde a cólera é endémica, nomeadamente na Cidade da Beira. Para além disso, o poder vibriocida está correlacionado com a protecção contra a cólera, podendo, em área endémica, ser utilizado como indicador de endemicidade e de susceptibilidade à cólera.

Uma vez que em Portugal não se realiza diagnóstico serológico de cólera, a investigadora efectuou um estágio na Unidade de Cólera e outros vibriões – Centro Nacional de Referência de Cólera e Vibriões do Instituto Pasteur de Paris (França). O estágio, realizado em Junho de 2004, teve por objectivo a aprendizagem da técnica do Poder vibriocida – método simplificado em microplacas para detecção de anticorpos vibriocida para *Vibrio cholerae* O1.***

Após a conclusão do estágio, a investigadora procedeu à transferência da técnica para o Laboratório de Bacteriologia da Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Instituto de Higiene de Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (Portugal).****

*** Estágio realizado na Unidade de Cólera e outros vibriões – Centro Nacional de Referência de Cólera e Vibriões, Instituto Pasteur de Paris (Director: Dr. Jean-Michel Fournier), sob orientação de Dr. Alain Boutonnier e de Dr. Alain Guénolé.

**** Técnica realizada na Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis, Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa (Directora da Unidade: Prof. Doutora Filomena Exposto), com o apoio da Dr.ª Emília Prieto.

Foram replicadas as estirpes bacterianas de referência e confirmada a natureza e viabilidade das estirpes resultantes antes de proceder à sua conservação a -80°C . A técnica, tal como se encontra descrita a seguir, foi testada três vezes com sucesso, utilizando soros de referência. As estirpes bacterianas, os soros de aglutinação e os soros de referência foram cedidos pela Unidade de Cólera e outros vibriões – Centro Nacional de Referência de Cólera e Vibriões do Instituto Pasteur de Paris. Apenas após garantido o sucesso na transferência da técnica se procedeu à análise da amostra.

A detecção de anticorpos vibriocidas na amostra de 136 soros foi assim realizada, pela investigadora, durante o mês de Setembro de 2005 no Laboratório de Bacteriologia da Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Instituto de Higiene de Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa. Os doseamentos serológicos foram realizados em duplicado para confirmação dos resultados.

Poder vibriocida – método simplificado em microplacas para detecção de anticorpos vibriocida para *Vibrio cholerae* O1 ^{11,67}

Realização em ambiente esterilizado (bico de Bunsens)

Material

- Estirpes de *Vibrio cholerae* O1 serotipo Inaba (CNRVC 950707) e serotipo Ogawa (CNRVC 960250) isoladas em doentes do Mali em 1995 e 1996 respectivamente, gentilmente cedidas pela Unidade de Cólera e outros vibriões – Centro Nacional de Referência de Cólera e Vibriões, Instituto Pasteur de Paris. As estirpes bacterianas foram conservadas em meio de Brucella (Becton Dickinson 211088) com 10% de glicerol conservadas a -80°C (ver a fórmula em anexo).
- Meio de enriquecimento de Vibrião (BIORAD 55914C)

- Placas de Petri com gelose nutritiva alcalina – GNA (ver a fórmula em anexo)
- Soro fisiológico tamponado esterilizado (ver a fórmula em anexo)
- Complemento de coxaia liofilizado (SIGMA S – 1639)
- Cloreto de neotetrazolio (SIGMA N – 2259)
- Succinato de sódio $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ MM 270,15
- Meio Luria Bertani (Meio LB) (ver a fórmula em anexo)
- Micro-placas de 96 poços de fundo redondo com tampa esterilizadas
- Pipetas simples e multicanais com pontas de pipetas esterilizadas
- Espectofotômetro a 600 nm
- Aliquots esterilizados
- Tubos esterilizados
- Placas de Petri redondas e quadradas esterilizadas
- Fios rectos esterilizados
- Gelo picado
- Papel de alumínio
- Tabuleiro de esmalte
- Estufa a 37°C
- Frigorífico a +4°C
- Luvas
- Motor de pipetas

Descrição do protocolo:

Dia 1

- Prepararam-se as suspensões bacterianas, semeando cada estirpe bacteriana (Ogawa e Inaba) em meio líquido de enriquecimento de Vibrião (BIORAD 55914C) (um tubo por estirpe). As suspensões bacterianas resultantes foram então colocadas na estufa a 37°C durante uma noite, assim como 12 placas de Petri com GNA (gelose nutritiva alcalina) para aquecer os meios.
- Prepararam-se as diluições dos soros humanos em microplacas de 96 poços de fundo redondo esterilizadas, que foram conservadas a +4°C durante uma noite. Cada soro foi inicialmente diluído em soro fisiológico tamponado numa diluição 1/20. As diluições seguintes foram realizadas em microplacas (1 microplaca por estirpe bacteriana). No primeiro poço da primeira coluna de cada microplaca colocaram-se 50 µl de cada soro numa diluição 1/20, preenchendo-se os restantes poços com 25 µl de soro fisiológico tamponado, e diluindo-se, seriadamente, os soros de ½ em ½ até uma diluição 1/40960, com uma pipeta multicanais de 25µl, desperdiçando 25 µl da última diluição de cada soro. O controlo positivo foi um anticorpo monoclonal F-22-30 anti Ogawa e anti Inaba com título vibriocida conhecido, numa diluição 1/20. O controlo negativo foi um soro humano negativo.

Dia 2

- As culturas bacterianas realizadas na véspera foram distribuídas pelas placas de GNA, em inóculos de 1 ml por placa (6 placas por estirpe bacteriana, Ogawa e Inaba), deixando repousar um minuto. O excedente em cada placa foi aspirado e desperdiçado. As placas foram então incubadas a 37°C durante 90 minutos.

- A cada placa adicionou-se 2,5 ml de soro fisiológico tamponado esterilizado, preparando uma suspensão bacteriana por agitação suave com um fio recto, sendo a suspensão aspirada para tubo esterilizados (1 tubo por estirpe, Ogawa e Inaba), com o objectivo de formar suspensões bacterianas com soro fisiológico tamponado esterilizado contendo 3×10^8 unidades formadoras de colónia/ml, o que corresponde a uma DO_{600} de cerca de 0.7 – 0.8.
- O complemento de cobaia liofilizado SIGMA S-1639 foi reconstituído com soro fisiológico tamponado esterilizado.
- Num tubo esterilizado adicionaram-se 1 ml do complemento de cobaia reconstituído com 3,5 ml de soro fisiológico tamponado esterilizado e 0,5 ml da suspensão bacteriana preparada anteriormente (1 tubo por estirpe, Ogawa e Inaba). Deixou-se incubar 20 minutos em gelo picado.
- Em cada poço das microplacas contendo os soros diluídos, colocaram-se 25 µl da mistura de complemento / suspensão bacteriana. Incubaram-se as microplacas com a tampa durante uma hora a 37°C.
- A cada um dos poços das microplacas adicionou-se 150 µl de meio LB.
- Incubaram-se as microplacas em câmara húmida durante duas horas a 37°C (num tabuleiro recoberto com papel de alumínio), sem tampa, para evitar condensação.
- Em paralelo, foi preparada uma solução (1 volume + 9 volumes) a partir de uma solução a 0.1% de cloreto de neotetrazolio (1 volume) e de uma solução a 2.7% de succinato de sódio (9 volumes).
- Em cada poço das microplacas, adicionou-se 25 µl da solução de cloreto de neotetrazolio e succinato de sódio. O cloreto de neotetrazolio é um substracto incolor utilizado pelas bactérias. Esta molécula é reduzida pelas enzimas

bacterianas, originando um produto de cor violeta. Esta reacção permite a leitura a olho nu após cerca de 18 horas a +4°C. As bactérias coradas depositam-se no fundo dos poços das placas.

- Colocaram-se as placas em câmara húmida recobertas com papel de alumínio a +4°C durante uma noite.

Dia 3

Procedeu-se à leitura das placas a olho nu. O título vibriocida é dado pela diluição mais forte que provoca lise bacteriana. Os títulos inferiores a 1/20 foram considerados negativos.

Análise e tratamento dos dados

A base de dados e a análise descritiva dos dados foi efectuada em Epi - info® (versão 3.3.2) e MS Excel®. O processamento do texto foi efectuada em MS Word®.

Instrumento de notação (em anexo)

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

A amostra era constituída por 136 indivíduos de ambos os sexos, de idade superior a 15 anos, com residência na Cidade da Beira, em Moçambique , que nunca tinham sido submetidos a vacinação contra a cólera. A amostra corresponde a 0,04% da população com idade igual ou superior a 15 anos da Cidade da Beira, segundos os dados demográficos estimados de 2003, calculados com base numa taxa de crescimento populacional anual de 2,4%.

Na amostra, mais de $\frac{3}{4}$ dos indivíduos pertenciam ao sexo feminino (105 indivíduos, 77%). A média de idades foi de 28 anos e a moda foi de 20 anos, variando a população em estudo entre os 17 e os 48 anos.

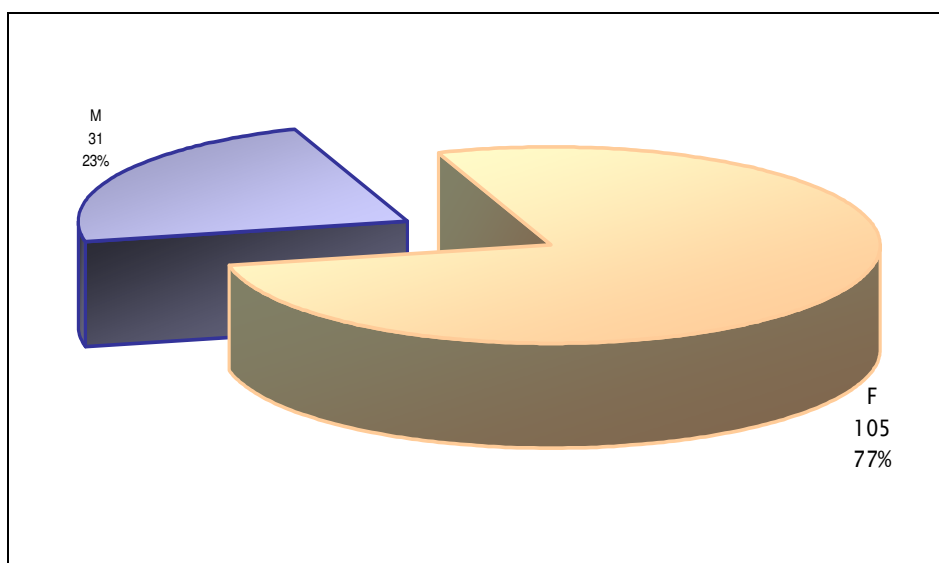


Gráfico 6 - Distribuição da amostra de acordo com o género (N=136)

(M – Masculino, F – Feminino)

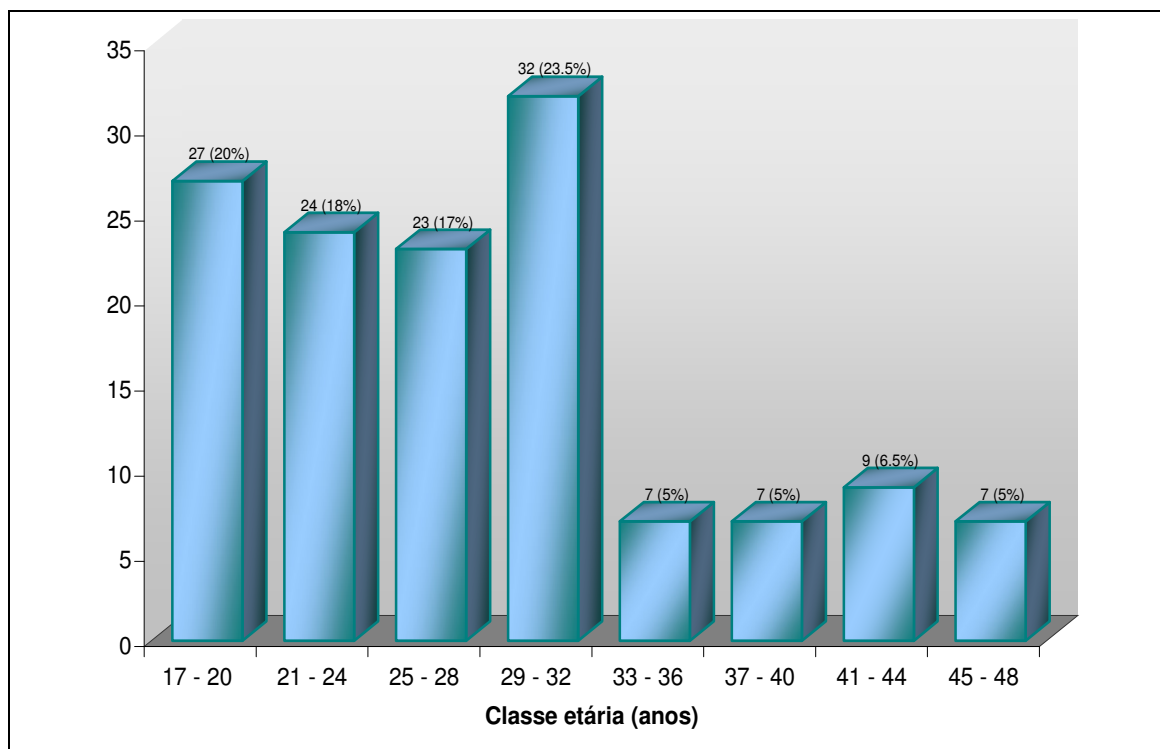


Gráfico 7 – Distribuição da amostra de acordo com a idade (N=136)

A ocupação profissional predominante foi a de doméstico (99 indivíduos, 73%). As restantes ocupações profissionais referidas foram por ordem decrescente de frequência: estudante (6), administrativo (5), camponês (5), comerciante (4), professor (3), empregado de construção civil (2), enfermeiro (2), alfaiate (2), guarda (1), padeiro (1), pastor (1), pescador (1), servente (1), curandeiro (1). Em dois casos não havia referência à ocupação profissional.

Aplicando o método simplificado em microplacas para detecção de anticorpos vibriocida para o *Vibrio cholerae* O1 obtiveram-se os seguintes resultados:

- Um soro cuja título de anticorpos vibriocida variou entre 1/80 – 1/160 para a estirpe Ogawa e entre 1/40 – 1/80 para a estirpe Inaba, sendo considerado positivo para ambas as estirpes.

- Um soro cujo título de anticorpos vibriocida variou entre 1/320 – 1/640 para a estirpe Ogawa e entre 1/320 – 1/1280 para a estirpe Inaba, sendo considerado positivo para ambas as estirpes.
- Um soro cujo título de anticorpo antibriocida variou entre 1/20 – 1/40 para a estirpe Ogawa e foi negativo para a estirpe Inaba, sendo considerado fraco positivo para a estirpe Ogawa.
- Os restantes soros foram negativos tanto para a estirpe Ogawa como para a estirpe Inaba.

Todos os soros com títulos positivos eram provenientes do Centro de Saúde de Ponta Gêa.

Assim, na amostra em estudo, a seroprevalência global de cólera por serogrupo O1 foi 2,2%. A seroprevalência de cólera por *Vibrio cholerae* O1 estirpe Ogawa foi de 2,2% e a seroprevalência de cólera por *Vibrio cholerae* O1 estirpe Inaba foi de 1,4%.

DISCUSSÃO

Discussão metodológica

Em Moçambique, a cidade da Beira é uma zona crítica de cólera, tanto a nível nacional como internacional. De acordo com a análise dos dados notificados oficialmente, existem casos de cólera ao longo de todo o ano, com surtos epidémicos entre Janeiro e Junho de cada ano, o que faz desta cidade uma das regiões onde a cólera tem mais impacto a nível da população.

Contudo, a real dimensão da cólera e seu impacto não são conhecidos. Os dados existentes não estão analisados e são baseados apenas na notificação obrigatória dos casos de doença. Por um lado, globalmente, estima-se que nem todos os casos de doença sejam notificados. Por outro lado, em Moçambique, o diagnóstico de caso é efectuado apenas com base em critérios clínicos não uniformizados. Além disso, sabe-se que mais de $\frac{3}{4}$ das infecções por *Vibrio cholerae* O1 El Tor são assintomáticas ou clinicamente pouco importantes. Deste modo, o próprio tipo diagnóstico pode contribuir para a subnotificação da cólera.

Tendo por base população alvo estimada em cerca de 500.000 habitantes (população da Cidade da Beira), este estudo foi realizado numa amostra de 136 indivíduos adultos (0,04% da população alvo), o que faz dela uma amostra de conveniência, não representativa da população, e inviabiliza a extrapolação dos resultados para a população em geral.

A amostra em estudo foi seleccionada em 2 Centros de Saúde da Cidade da Beira, de entre os indivíduos que recorreram voluntariamente ao Gabinete de aconselhamento e teste voluntário para o VIH (vírus da imunodeficiência humana), durante o mês de Novembro de 2003, que concordaram participar no estudo. Na Cidade da Beira, os centros de saúde não estão associados a áreas geográficas (bairros) pré-definidas

de prestação de cuidados de saúde, podendo qualquer habitante recorrer a qualquer centro de saúde da cidade, independentemente da sua área de residência. Por outro lado, a participação no estudo implicava a colheita de uma amostra de sangue venoso periférico. Em Moçambique, por questões culturais, a população é de um modo geral pouco receptiva à colheita de sangue. Assim, na amostra em estudo pode existir um viés de selecção no sentido de uma população mais receptiva aos cuidados de saúde e eventualmente mais esclarecida ou sensibilizada para as questões de saúde.

Foi realizado estudo seroepidemiológico descritivo transversal com o objectivo de avaliar a imunidade basal dos indivíduos e consequente protecção contra a cólera na amostra populacional. Em termos serológicos as duas técnicas mais utilizadas, em termos práticos, são o doseamento de anticorpos vibriocida e o doseamento de anticorpos anti-toxina.^{2,11,12} A correlação entre a presença de anticorpos vibriocida e o contacto com o *Vibrio cholerae* e protecção contra a cólera está bem documentada em diversos estudos epidemiológicos realizados em zona endémica.^{2,15,17,20,27,28,29,30} É presentemente o único teste serológico válido para avaliação de imunidade protectora contra a cólera.^{1,2} Ao contrário, não há correlação estabelecida entre o contacto com o vibrião e a presença de anticorpos antitoxina, o que, em parte pode, ser explicado pela reacção cruzada existente com a toxina termolábil da *Escherichia coli*, uma causa importante de diarreia aguda em áreas endémicas em cólera.^{2,17}

O doseamento de anticorpos vibriocida no soro é conhecido desde 1962. A técnica foi adaptada na década de 90: passou a ser realizada em microplacas e os resultados passaram a ser lidos visualmente com recurso a um teste cromogénico simples.¹¹ A técnica levantava contudo alguns problemas relacionados com o complemento utilizado, as estirpes bacterianas e as condições de crescimento

bacteriano que induziam variabilidade nos resultados. A. Boutonier et al (2003) optimizaram a técnica introduzindo material *standard* e passos de controlo de qualidade na sua realização: uniformização dos *timings* e passos do protocolo; utilização de complemento de coxaia liofilizado comercial SIGMA®; utilização de estirpes bacterianas de referência; controlo das suspensões bacterianas por espectrofotometria; possibilidade de leitura dos resultados por espectrofotometria.⁶⁷

No global, a técnica de doseamento de anticorpos vibriocida por microtitulação em placas tem características particulares que a tornam exequível em regiões com suporte laboratorial bacteriológico básico e pouco desenvolvido, como acontece em muitas regiões urbanas assoladas pela cólera, nomeadamente a Cidade da Beira. É uma técnica simples, pouco dispendiosa que pode ser executada num laboratório de microbiologia básico. A sua aprendizagem é fácil e rápida. Os resultados são obtidos em menos de 72 horas e a sua leitura pode ser efectuada a olho nu.^{11,12,67} A principal desvantagem da técnica é utilizar culturas bacterianas vivas, o que tem implicações quando se equaciona a gestão dos resíduos em meios laboratoriais menos desenvolvidos.¹² A utilização de lixívia como desinfectante é contudo muito eficaz.

A realização deste estudo implicou um processo de aprendizagem e de transferência tecnológica. A investigadora aprendeu a executar a técnica num laboratório de referência (Centro Nacional de Referência da Cólera e Vibriões do Instituto Pasteur, Paris) e seguidamente procedeu à sua transferência e montagem no laboratório de bacteriologia da Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa. Para assegurar o sucesso deste processo e garantir a fiabilidade dos resultados foram tidas as seguintes precauções:

- Certificação de aprendizagem da técnica pelo Centro Nacional de Referência de Cólera e Vibriões do Instituto Pasteur (Paris).
- Utilização de estirpes bacterianas de referência cedidas pelo Centro Nacional de Referência de Cólera e Vibriões do Instituto Pasteur (Paris) replicadas e conservadas após controlo microbiológico, segundo as directrizes do referido Centro.
- Utilização de complemento de cobaia liofilizado SIGMA® do mesmo lote durante toda a experiência e seguindo rigorosamente as normas de conservação e utilização do fabricante.
- Seguimento rigoroso do protocolo da técnica, respeitando as referências dos produtos e materiais comerciais inclusos, assim como das fórmulas dos meios de cultura e produtos laboratoriais, tal como preconizado pelo Centro Nacional de Referência de Cólera e Vibriões do Instituto Pasteur (Paris).
- Testagem da técnica com soros de referência e testagem dos meios realizados no laboratório, como método de controlo de qualidade e garantia do sucesso na transferência tecnológica, antes de proceder à aplicação da técnica aos soros da amostra.
- Realização da titulação de anticorpos vibriocida no soro em duplicado para confirmação dos resultados. Os resultados podem variar de forma não valorizável até três títulos desde que mantido o limiar de detecção.

A amostra de soros foi obtida a partir de amostras de sangue venoso periférico colhidas de forma asséptica, submetidas de imediato a centrifugação. Os soros foram seguidamente refrigerados a +4°C, sendo colocados a -20°C assim que possível e assim conservados até à realização do doseamento de anticorpos vibriocida. Desde a colheita da amostra até à realização do doseamento de

anticorpos vibriocida decorreram 22 meses, o que pode eventualmente ter condicionado os resultados, tornando negativos títulos vibriocida baixos ou *border-line*.

Discussão dos resultados

A 7ª pandemia de cólera (1961 – presente), atribuída a um serogrupo emergente (*Vibrio cholerae* O1 El Tor), modificou o panorama global da cólera, tornando-se na pandemia conhecida de cólera mais prolongada e com maior difusão geográfica.^{1,2,3} Deu origem a novos focos mundiais de epidemo-endemicidade associados a elevada morbi-mortalidade e comprometendo as infra-estruturas de saúde, políticas e sócio-económicas das regiões atingidas.^{2,3} A elevada, fácil e rápida mobilidade das populações entre regiões, países e continentes, associada à elevada taxa de infecção assintomática ou inaparente característica do serogrupo El Tor (75%), alertou para a irrelevância das fronteiras geográficas e para a facilidade de difusão das epidemias de cólera.^{2,3,4,5} Este contexto despoletou um renovado interesse e investimento científico, político e sócio-económico face a uma doença que se mantém longe de estar controlada, continuando a ameaçar as populações e a interferir no desenvolvimento dos países.

A introdução da cólera no continente africano na década de 70 resultou no novo foco de epidemo-endemicidade com maior impacto em termos internacionais.^{2,3} Nesta região parece que a cólera veio para ficar. Em 2001, 94% dos casos notificados de cólera a nível mundial ocorreram no continente africano, correspondendo a 173.359 casos notificados.⁵⁶ Apesar disso, pouco se conhece sobre a cólera nos países africanos. De um modo geral, o sistema de vigilância epidemiológica é inexistente ou pouco eficaz.

Em surtos epidémicos de cólera no continente africano foram isolados: *Vibrio cholerae* O1 El Tor serotipo Inaba (Malawi 1988) e *Vibrio cholerae* O1 El Tor serotipo Ogawa (Uganda 1997 e Djibouti 2000).^{58,60,61}

Em Moçambique entre 2001 e 2003, o número de casos notificados aumentou de 8.794 para 13.758, sendo o terceiro país mais afectado pela cólera a nível mundial em 2003.^{42,56}

A cidade da Beira, Moçambique, é considerada uma zona endémica de cólera. Em 1998 registaram-se 14.407 casos de cólera (taxa de incidência de 3,5% e taxa de letalidade de 2%), correspondendo à última epidemia de cólera em Moçambique (1997–2000). De 2000 a 2002 registaram-se 13.251 casos de cólera com taxa de incidência anual estável (0,8 – 0,9%), ocorrendo maior número de casos entre Janeiro e Junho de cada ano (surtos anuais).

Na cidade da Beira, o diagnóstico de cólera é efectuado com base nas manifestações clínicas, segundo o critério do profissional de saúde, não existindo uma definição de caso uniformizada. De um modo geral, não se procede ao diagnóstico microbiológico ou serológico da doença, por falta de infra-estrutura logística e técnica.

O biótipo El Tor está associado a taxa de infecção inaparente elevada (75%) e, frequentemente, formas clínicas ligeiras, que são indistintas da gastroenterite comum (patologia muito frequente em países onde a cólera é endémica).² Deste modo, embora a notificação da cólera com base na definição de caso clínica preconizada pela OMS permita uma detecção mais precoce das epidemias, medir o impacto da cólera nas populações apenas com base nesse tipo de notificação pode subestimar grandemente o verdadeiro impacto da doença. Além disso, pode haver subnotificação dos casos de cólera, resultante de eventuais questões logísticas e/ou

organizacionais, e mesmo por dificuldade na acessibilidade aos cuidados de saúde, o que pode inviabilizar por si só a identificação dos casos.

A distinção entre cólera e gastroenterite infecciosa pode ser sobretudo difícil nas crianças.^{2,4,5} Isso pode, em parte, justificar o menor número de casos notificados em crianças comparativamente aos adultos da Cidade da Beira. De facto, estes dados, obtidos na cidade da Beira, entram em contradição com os dados epidemiológicos obtidos em zonas endémicas que indicam as crianças como o grupo populacional mais afectado.

Nesta sequência, os estudos de seroprevalência, ao revelarem o contacto da população com a infecção por *Vibrio cholerae*, em função da resposta imunitária desenvolvida, permitem um diagnóstico mais fiável e podem traduzir de forma mais rigorosa o impacto da doença na população.

A seroprevalência de cólera numa amostra de 136 indivíduos adultos residentes na Cidade da Beira em 2003, através da titulação de anticorpos vibriocidas para o *Vibrio cholerae* O1, foi 2,2%. Ambas as estirpes O1 (Inaba e Ogawa) foram serologicamente identificadas (1,4% e 2,2% respectivamente).

Este estudo representa o primeiro estudo de seroprevalência de cólera realizado em Moçambique. Foi efectuado em período inter-epidémico, 5 anos após a epidemia de 1998, numa população não vacinada contra a cólera. Deste modo, os resultados serológicos obtidos reflectem a exposição da população à infecção natural por *Vibrio cholerae* inerente à residência em área endémica.

De entre os estudos seroepidemiológicos realizados em área endémica, utilizando o poder vibriocida do soro, salientam-se:

- No Bangladesh, seroprevalência de 48% numa amostra de 232 indivíduos doentes hospitalizados, portadores assintomáticos e contactos 6–8 meses

após hospitalização dos casos índice (47,4% nos doentes, 50% nos portadores assintomáticos e 54,4% nos contactos).²⁹

- Na Algéria (1987), seroprevalência de 37,6%, numa amostra de 141 indivíduos adultos doentes, portadores assintomáticos e contactos, 1 e 5 anos após epidemia (45,8% nos doentes, 29,8% nos portadores assintomáticos e 37% nos contactos).³⁰
- Na Algéria (1992), seroprevalência de 53%, numa amostra de 195 indivíduos adultos dadores de sangue 6 anos após epidemia.³¹
- No Mali (1992), seroprevalência de 45%, numa amostra de 48 indivíduos entre os 5 e os 62 anos de idade 8 anos após epidemia.³¹

Em contraponto, em Paris – França (1987), uma área sem cólera, a seroprevalência (poder vibriocida do soro) foi de 2,72% (N= 3.856 dadores de sangue), tendo sido atribuída a eventual vacinação prévia ou casos de cólera tratados importados em alguns indivíduos da amostra.³¹

Os resultados obtidos na cidade da Beira, *a priori* parecem enquadrar-se mais no estudo realizado em Paris do que nos estudos realizados em área endémica. Isto parece um contra-senso, uma vez que Moçambique e a Cidade da Beira são consideradas áreas endémicas de cólera, em virtude dos casos notificados de cólera, seu impacto, sua regularidade e distribuição na população. De notar, contudo, que os dois primeiros estudos exemplificados se baseiam em critérios de selecção que implicam evidência de contacto prévio com a doença e nos restantes a amostragem não foi representativa, à semelhança do estudo realizado na cidade da Beira. Assim sendo, a comparação ou extrapolação de resultados fica claramente comprometida.

A população da Cidade da Beira caracteriza-se por elevada mobilidade: desloca-se facilmente entre os diferentes bairros da cidade; enceta migrações regulares e/ou

periódicas entre os diversos distritos da província de Sofala, e mesmo entre as províncias moçambicanas. O conceito de local de residência é assim muito variável. Esta dinâmica populacional constante poderá condicionar a exposição dos indivíduos à cólera, gerando grupos / indivíduos com diferentes níveis de susceptibilidade à doença, e que também dificulta o mapeamento geográfico dos casos na população. Por outro lado, o próprio processo de amostragem tem incluso um viés de selecção (ver Discussão Metodológica).

Estes factores poderão ter contribuído para a baixa seroprevalência encontrada.

A presença de anticorpos vibriocidas no soro está consistentemente correlacionada com a protecção contra a cólera, reflectindo assim a imunidade adquirida à doença.^{2,15,17,20,27,28,29,30} A seroprevalência de anticorpos protectores contra a cólera (anticorpos vibriocida) é por isso uma medida de imunidade de grupo (*herd immunity*).⁶⁸ Pode igualmente ser considerada com indicador da susceptibilidade da população à infecção em causa.^{2,15,28}

Assim, tendo em conta a seroprevalência de cólera obtida (2.2%), a amostra estudada pode ser considerada muito susceptível à infecção pelo *Vibrio cholerae*, constituindo, em função dos resultados obtidos, uma amostra populacional globalmente não imune à cólera.

Para além da cólera, a infecção VIH/SIDA constitui um importante problema de saúde pública em Moçambique e na cidade da Beira. Efectivamente, o programa de vigilância sentinela para a infecção VIH entre mulheres grávidas, na cidade da Beira, detectou uma taxa de seropositividade entre 20 a 30%.⁶⁶

A cólera, de um modo geral, não é considerada uma infecção clinicamente importante no contexto da infecção VIH/SIDA.⁵⁰ No entanto, esta interacção foi raramente focada nos estudos realizados, não existindo dados consistentes que sugiram uma relação entre a susceptibilidade à cólera e a infecção VIH/SIDA.

Sabe-se que os serogrupos de *Vibrio cholerae* O1 sem potencial epidémico podem esporadicamente originar infecções graves em indivíduos imunossuprimidos.^{2,4,5} E, num estudo realizado em 143 crianças vítimas de uma epidemia de cólera no Zaire (prevalência de seropositividade VIH de 4.9%) o risco de morte foi significativamente mais elevado nas crianças com infecção VIH com idade inferior a 18 meses, o mesmo não se verificando nas crianças com idade superior a 18 meses.⁶⁹ Por outro lado, a imunização oral contra a cólera, por intermédio de vacinas viva e inactivada, está demonstrada como segura e imunogénica em indivíduos com infecção VIH, embora existam poucos estudos a abordar esta problemática.^{41,50,51,53}

Isto leva por um lado a ponderar até que ponto poderá a seropositividade para infecção VIH interferir na susceptibilidade à infecção/doença por *Vibrio cholerae* O1, na seroprevalência da cólera em região endémica, e consequentemente na imunidade adquirida à infecção. Por outro lado, tem implicações importantes no planeamento da estratégia de prevenção e combate da cólera em áreas endémicas, e nomeadamente na cidade da Beira (Moçambique).

O modelo de cólera como doença transmissível está em mutação, fruto do conhecimento resultante do avanço tecnológico na investigação do *Vibrio cholerae*: ubiquidade do vibrião em meios aquáticos como constituinte do fitoplâncton em simbiose com o zooplâncton, capacidade de sobrevivência do vibrião em meios adversos, emergência de estirpes toxigénicas a partir das não toxigénicas por recombinação genética e mediante as condições ambientais.⁷ Estes novos dados vão condicionar a estratégia de prevenção e combate, que implicarão o controlo do *Vibrio cholerae* no ambiente, em detrimento da sua erradicação.⁷

Apesar da ubiquidade do vibrião, a cólera mantém-se endémica em determinadas regiões do mundo, geralmente áreas em vias de desenvolvimento onde as condições sócio-económico-sanitárias são precárias.⁷ Isso reforça a importância do

investimento no desenvolvimento dos países com a inerente criação de infra-estruturas eficazes de saneamento básico e saúde pública, o que aliás é preconizado pela OMS.⁴⁰

A criação de infra-estruturas higieno-sanitárias é um processo essencial mas moroso, enquadrando-se numa estratégia a longo prazo urgente e necessária que tem subjacente o próprio desenvolvimento global dos países atingidos.

Entretanto, o que pode ser feito a curto – médio prazo?

A OMS definiu também as restantes as linhas orientadoras da estratégia de prevenção e controlo das epidemias de cólera, que passam por: aprovisionamento e distribuição de água potável, construção de estruturas básicas de controlo de resíduos sólidos, estruturação da resposta de emergência à epidemia e criação de um sistema de vigilância epidemiológica, gestão adequada dos casos de doença e seus contactos, e, criação de programas de educação para a saúde centrados na higiene individual e colectiva.^{5,40,41}

Em Moçambique, e na cidade da Beira em particular, a gestão das epidemias de cólera é essencialmente reactiva. Fundamenta-se na preparação para uma resposta de emergência às epidemias, à semelhança do que ocorre em muitos países onde a cólera é endémica. Esta estratégia permitiu a redução da mortalidade associada à cólera, dada pela diminuição progressiva da taxa de letalidade nas epidemias, mas não limita a infecção nem previne novos casos de doença. (ver «A Cólera – Análise da situação em Moçambique e na cidade da Beira»: Gráfico 1). Há, por isso, lugar para a optimização da estratégia de prevenção e combate da cólera.

De Dezembro de 2003 a Janeiro de 2004 decorreu, na Cidade da Beira, um projecto inovador no âmbito da utilização da imunização oral contra a cólera em área endémica. Foi efectuada uma campanha de vacinação em massa contra a cólera, sendo administrada a vacina oral inactivada WC/rBS em duas doses. Onze mil e

setenta indivíduos (população alvo de 19.550 indivíduos) completaram a vacinação (2 doses). A protecção conferida pela vacina foi de 78 – 84% aos até aos 5 meses.⁷⁰

O papel da vacinação oral na prevenção e controlo das epidemias de cólera e doença endémica tem sido equacionado desde há vários anos.⁴¹

A OMS preconiza a utilização da imunização oral contra a cólera como ferramenta de saúde pública complementar à estratégia clássica de prevenção e combate da cólera nas populações com risco elevado de epidemia e em contexto endémico com surtos epidémicos frequentes.^{1,41,43,44} A cidade da Beira exemplifica uma área endémica de cólera com surtos epidémicos regulares, constituindo um potencial alvo para o recurso à vacinação.

Os estudos realizados com as duas vacinas orais disponíveis (WC/rBS e CVD 103–HgR) demonstraram a sua segurança e imunogenicidade, características essas documentadas mesmo em área endémica no caso da vacina WC/rBS.^{1,2,41,43,44} Em casos isolados, estas vacinas foram utilizadas em campanhas de vacinação em massa na prevenção e controlo de epidemias de cólera, para além do exemplo de Moçambique acima descrito: Uganda em 1997, Estados Federados da Micronésia e República das Ilhas Marshall em 2000.^{45,55}

A vacinação é, por excelência, uma das principais armas de saúde pública no controlo das doenças transmissíveis. A sua importância advém, por um lado, do efeito protector directo da vacinação e, por outro, do seu efeito protector indirecto adicional resultante da redução da intensidade de transmissão da doença entre populações vacinadas, ou seja, imunidade de grupo (*herd immunity*).

No caso da cólera, os estudos de avaliação da eficácia da vacinação realizados no Bangladesh na década de 80 documentaram uma eficácia protectora de cerca de 80% aos 6 meses e de cerca de 60% aos 3 anos nos indivíduos vacinados (vacina

WC/BS).^{36,37,38,39} Foi igualmente demonstrado que a vacinação não só prevenia como reduzia a gravidade dos casos de doença.⁴⁷

Recentemente, a re-análise dos dados dos estudos realizados no Bangladesh demonstrou que a vacinação oral inactivada contra a cólera induz imunidade de grupo significativa.^{71,72} Este dado novo veio salientar o papel da vacinação como medida de saúde pública no controlo da cólera em áreas endémica, reforçando neste âmbito as recomendações da OMS.

No entanto, a definição de contexto de elevado risco, mesmo em área endémica não está estabelecida. Por outro lado, apesar da segurança e eficácia da vacinação estar documentada, em meio endémico, é ainda uma ferramenta onerosa, tanto pelo custo da vacina como pelo custo da implementação da vacinação. Além disso, em termos operacionais no terreno, a logística que a vacinação implica, pode condicionar a cobertura desejável da população.

Assim, apesar da imunização contra a cólera nas populações em risco em área endémica ser já considerada uma medida de saúde pública promissora e defensável, a sua implementação regular é complexa e polémica. A avaliação do risco, assim como os diversos factores que lhe estão subjacentes, de ordem técnico-logística, económica, financeira, ambiental, ética e social, limitam e comprometem a eficácia desta estratégia tanto a nível nacional como internacional.^{41,43,44} Da última reunião da OMS (*Global Task Force on Cholera Control* – Cairo, 2005) resultaram recomendações no sentido de colheita de dados que permitam uma melhor definição de endemicidade e de avaliação do risco para o estabelecimento potencial de uma estratégia de vacinação.⁷³

Por outro lado, e no caso específico da cidade da Beira, na implementação de um programa de vacinação, a elevada taxa de infecção VIH/SIDA deve ser considerada. A segurança e eficácia da vacinação oral contra a cólera nos indivíduos com infecção

VIH foram abordadas em apenas quatro estudos, mas que indicam que as vacinas orais são seguras nestes indivíduos.^{41,50,51,53}

Deste modo, a estruturação de um programa de vacinação contra a cólera seguro e eficaz neste contexto implica inevitavelmente aprofundar o conhecimento sobre a imunidade adquirida resultante de infecções entéricas e imunização oral, em geral e no caso específico da cólera.

Uma outra vertente primordial de uma estratégia eficaz de prevenção e controlo da cólera é a estruturação de um sistema de vigilância epidemiológica.^{40,41} Isso permite a detecção precoce da epidemia e consequente activação de um plano de intervenção organizado e dirigido.

Na cidade da Beira, o Centro de Tratamento de Cólera desempenha um papel central na vigilância epidemiológica ao funcionar como centro de referência de doentes com diarreia aguda não sanguinolenta. Contudo, o facto do diagnóstico de cólera ser efectuado com base numa definição de caso clínica e não uniformizada condiciona a detecção precoce das epidemias, que é preconizada pela OMS, e o consequente atraso na activação da estratégia de intervenção. Frequentemente, isso obriga a desencadear a uma resposta de emergência em contexto de caos e pânico geral, o que pode comprometer a eficácia e celeridade da intervenção.

Neste contexto, os métodos serológicos, designadamente o poder vibriocida, podem ter interesse como ferramenta na vigilância epidemiológica da cólera na cidade da Beira. Em área endémica, o poder vibriocida reflecte a imunidade adquirida da população, podendo ser utilizado como indicador de endemicidade e de susceptibilidade à cólera.^{2,15,18,29,30,31} Além disso, em área de endemo – epidemicidade, como é o caso da cidade da Beira, os surtos epidémicos tendem a ocorrer quando a seroprevalência diminui.

Assim, a monitorização serológica da cólera através de rastreios regulares, aplicados à população em geral e/ou a grupos populacionais seleccionados, permitirá avaliar a evolução imunitária da população e definir o seu grau de susceptibilidade a um surto epidémico. Deste modo, será possível, com maior grau de certeza, definir populações vulneráveis e prever a ocorrência de um surto epidémico. De igual modo, será possível preveni-lo ao permitir definir precocemente um plano de intervenção específico, dirigido e contextualizado, assim como possibilitar a implementação atempada das medidas de intervenção. Isso pode ter importância por exemplo quando se pretende implementar uma campanha de vacinação ou quando se pretende estabelecer áreas prioritárias de intervenção.

Esta estratégia vai de encontro às recomendações da OMS (2005) de optimização dos sistemas de vigilância epidemiológica, visando melhor definir áreas de endemicidade, compreender a sazonalidade e localização dos surtos epidémicos, e melhorar a avaliação do risco de um potencial surto epidémico.⁷³ Os dados assim obtidos permitirão adequar e melhorar a eficácia das actividades de controlo.⁷³

O recurso ao doseamento de anticorpos vibriocida emerge como a indicada para fins de serovigilância, dado a correlação consistente entre o poder vibriocida e a protecção contra a cólera.^{15,17,20,27,28,29,30} Mas, para além disso, a própria técnica de doseamento de anticorpos vibriocida, tal como foi descrita por Boutonier et al (2003), é uma técnica simples e exequível em regiões com suporte laboratorial bacteriológico básico, como é o caso da cidade da Beira.

O estudo de seroprevalência de cólera realizado é um exemplo de sucesso de transferência tecnológica, em parte devida à facilidade de aprendizagem e execução da técnica, assim como à simplicidade da leitura e interpretação dos resultados.

O mesmo processo de transferência tecnológica pode ser equacionado para o Centro de Tratamento de Cólera da cidade da Beira, e com isso contribuir para a

vigilância epidemiológica da cólera na cidade da Beira. A técnica poderia também ser utilizada também no diagnóstico retrospectivos dos casos de cólera e avaliação dos contactos, em complemento da monitorização serológica da população por rastreio acima proposta.

Cidade da Beira – Que estratégia para o controlo da Cólera?

Na cidade da Beira, uma área de endemicidade de cólera, os surtos de cólera ocorrem de forma regular, geralmente na sequência da estação das chuvas. Os bairros da cidade com condições precárias de habitabilidade e saneamento e elevada densidade populacional são consistentemente as zonas mais atingidas.

A estratégia nacional de combate à cólera é essencialmente reactiva e tem por base um plano de intervenção organizada de emergência que é accionado quando é identificada uma epidemia de cólera. Esta estratégia permite minimizar a letalidade da epidemia mas não a previne.

Assim, que nova estratégia poderá ser equacionada em paralelo e complementando a estratégia existente de controlo da cólera na cidade da Beira, que integra a estratégia nacional de combate à cólera? Haverá lugar para a vacinação oral contra a cólera ser utilizada como ferramenta de saúde pública neste contexto? Como poderia isso ser equacionado?

A seguir, delineando, em traços gerais, os pontos principais de uma estratégia de controlo da cólera na cidade da Beira, a pertinência e viabilidade da inclusão da vacinação oral em massa na estratégia é analisada e discutida (Figura 2).

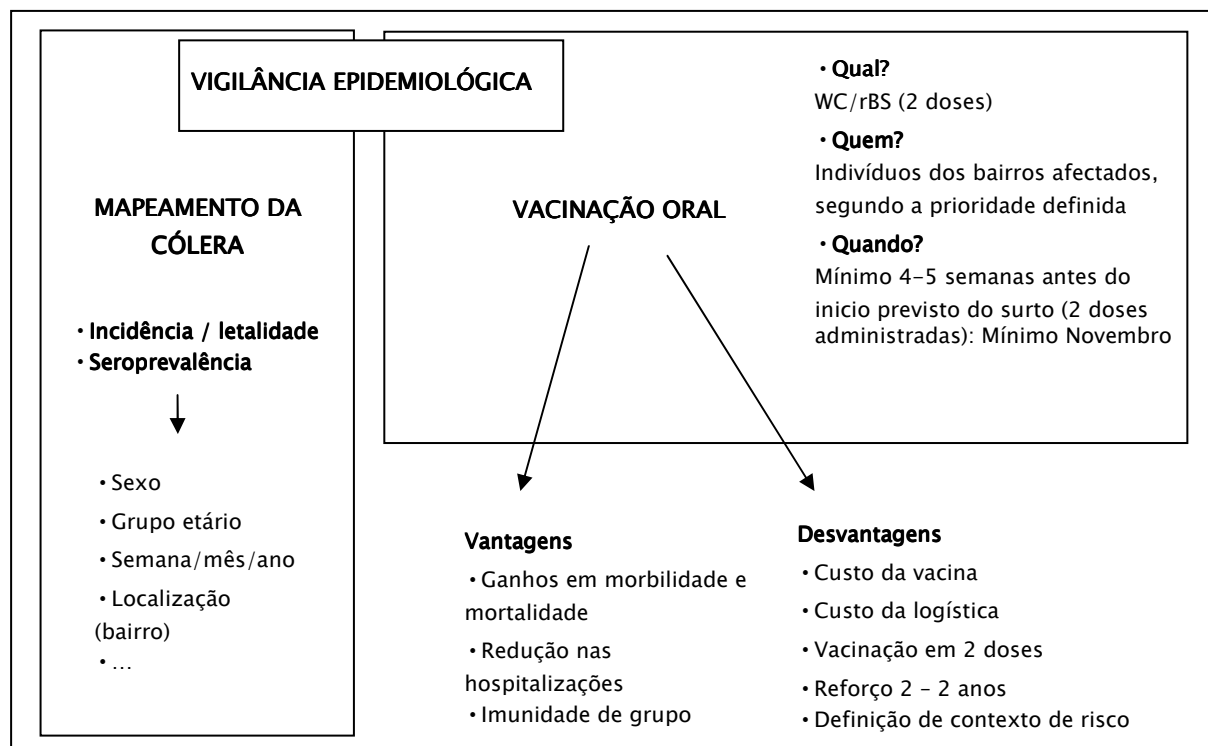


Figura 2 – Esquema de discussão da estratégia de controlo da cólera na cidade da Beira equacionando o recurso a campanhas de vacinação oral.

1 – Análise da situação com vista a mapear a cólera na cidade da Beira e definir zonas prioritárias de intervenção.

Sobre a cólera e a cidade da Beira sabe-se que:

- A cidade da Beira é uma das zonas mais afectadas pela cólera a nível nacional.
- Os casos de cólera são atribuídos ao *Vibrio cholerae* El Tor (serotipos Inaba e Ogawa), o que foi confirmado por um estudo microbiológico no âmbito de uma campanha de vacinação em massa⁷⁰ e no estudo de seroprevalência realizado neste trabalho.
- Entre 1999 e 2002 a incidência anual de cólera manteve-se estável (taxa de incidência anual de 0.8%, calculada a partir dos caso de cólera notificados).

- Existem casos de cólera uniformemente ao longo de todo o ano, verificando-se, de forma consistente, um aumento na incidência entre Janeiro a Junho de cada ano (surtos anuais).
- Os surtos de cólera estão relacionados com a época das chuvas, que decorrem geralmente de Novembro a Fevereiro.
- Os bairros com condições sanitárias precárias e elevada densidade populacional são os mais afectados.
- A taxa de infecção VIH é elevada.

Em área endémica, os surtos de cólera tendem a ocorrer de forma sazonal e periódica, sendo a sua regularidade própria de cada área. Assim, o conhecimento das características, distribuição e impacto da cólera na cidade da Beira permitirá definir tendências e equacionar uma intervenção dirigida, consistente e produtiva.

Pode ser vantajoso realizar o mapeamento segundo as seguintes perspectivas complementares entre si:

- Análise retrospectiva da incidência e letalidade da cólera, com base no levantamento dos casos e óbitos por cólera notificados. Como variáveis pertinentes sugerem-se: semana/mês/ano, localização geográfica/local de residência (bairro), idade e sexo.
- Se possível, proceder à análise retrospectiva da incidência da diarreia aguda, com base no levantamento dos casos de diarreia aguda registados nos livros de registos dos Centros de Saúde, segundo as mesmas variáveis. Isto pode ser importante já que a cólera pode manifestar-se clinicamente como gastroenterite comum.
- Estudo seroepidemiológico transversal com o objectivo de determinar a seroprevalência global de cólera e sua distribuição geográfica (por bairro),

utilizando a técnica de doseamento de anticorpos vibriocida do soro. O mapeamento serológico por esta técnica, como complemento ao de casos clínico, permite conhecer de forma mais precisa o real impacto da cólera na população e a imunidade de grupo. Admite-se que cerca de $\frac{3}{4}$ dos casos de infecção por *Vibrio cholerae* são assintomáticos ou passam por gastroenterites simples, mas mantém a circulação do vibrião. Idealmente, este estudo deverá ser conduzido em cada bairro, em amostras populacionais representativas.

2 – Implementar a vacinação oral em massa contra a cólera.

A utilização da vacinação oral contra a cólera como ferramenta complementar de saúde pública no controlo da doença tem sido alvo de discussão pela OMS. As áreas endémicas com surtos epidémicos recorrentes, como é o caso da cidade da Beira, são fortes candidatos para a sua utilização e as experiências isoladas efectuadas têm mostrado resultados promissores relativamente à eficácia da estratégia.

Na implementação de uma campanha de vacinação em massa na cidade da Beira, no sentido de otimizar os seus resultados e benefícios, é importante considerar:

- O tipo de vacina mais adequado: a OMS recomenda em primeira linha a vacina oral inactivada WC/rBS, uma vez que esta vacina foi testada com eficácia em região endémica. E, tendo em consideração a elevada prevalência estimada de infecção VIH na cidade da Beira, esta vacina é teoricamente mais segura se administrada, em massa, à população. De salientar que a vacinação é feita em duas doses, administradas com 8 dias de intervalo, sendo eficaz cerca de 4 a 5 semanas após a segunda dose. Tem eficácia máxima até aos 6 meses e o reforço está recomendado de 2 em 2 anos. Só deve ser administrada em indivíduos com idade superior a 2 anos.

- A logística inerente à conservação, distribuição e administração da vacina.
- O momento indicado para a vacinação: a administração deve estar completada no mínimo 5 semanas antes da data prevista para o início do surto epidémico, ou seja, no mínimo em Novembro.
- A população alvo: a análise da situação e mapeamento da cólera na cidade permite priorizar e hierarquizar as zonas de intervenção (bairros) segundo a susceptibilidade e o risco estimado da população nelas residentes. Os grupos populacionais considerados tipicamente mais susceptíveis (crianças e jovens com idade inferior a 15 e mulheres) carecem de atenção especial, uma vez que lhes é atribuído um papel importante no estabelecimento e amplificação da infecção na população.⁷² Idealmente, na perspectiva de obter imunidade de grupo e tentar quebrar a transmissão da doença, é desejável conseguir uma taxa elevada de cobertura na vacinação da população.
- A monitorização e avaliação da campanha: tem muita importância para definir o sucesso da campanha e determinar a pertinência da sua repetição e inclusão na estratégia local de controlo da cólera.

O equacionar da vacinação neste contexto não é linear e implica uma análise de custo – eficácia e ponderação das vantagens e desvantagens da vacinação.

As vacinas orais contra a cólera, nomeadamente a vacina inactivada WC/rBS, têm eficácia e segurança comprovada. Os estudos realizados com a vacina oral inactivada documentaram a sua eficácia na prevenção da infecção/doença, minimização da gravidade dos casos de doença e redução da colonização do intestino dos indivíduos pela bactéria. Deste modo, a sua utilização modifica como ferramenta de saúde pública reorienta a estratégia de controlo da cólera no sentido da prevenção de novos casos em vez da limitação da letalidade da doença, que é o objectivo principal da estratégia de controlo da cólera em vigor. Isto traduz-se na

redução da morbimortalidade e na minimização da hospitalização por doença, com todas as implicações sócio – económicas e políticas inerentes. Além disso, mais recentemente, foi demonstrada a sua capacidade de induzir imunidade de grupo, o que não só reforça os ganhos da vacinação, como pode melhorar a relação custo – efectividade dos programas de vacinação.

A vacinação é dispendiosa, não só pelo custo da vacina em si como pelo custo da logística para assegurar a correcta administração e cobertura de vacinação. O facto de a vacinação ser em duas doses limita igualmente a sua correcta administração, a garantia de adesão da população e de cobertura de vacinação.

Além disso, a nível internacional, os contextos de risco elevado onde a OMS preconiza a vacinação continuam mal definidos. Pode a cidade da Beira ser considerada um contexto com risco suficientemente elevado para justificar os encargos inerentes a uma campanha de vacinação?

Moçambique gasta cerca de 145 milhões de Euros por ano na estratégia nacional de controlo da cólera, que é baseada numa intervenção de emergência desencadeada pelo reconhecimento de uma epidemia de cólera.⁴¹ As epidemias de cólera deram o caos, induzem uma pressão incalculável sobre o actual sistema de saúde e repercutem-se de forma não quantificada nas famílias, comunidades e nas estruturas sócio-económicas e políticas.

O modelo de custo – eficácia realizado no Bangladesh, uma área endémica de cólera, preconiza que, para a utilização da vacinação como ferramenta de saúde pública em meio endémico, o custo da vacina e logística inerente à vacinação teria de ser muito baixo, sendo possível obter uma boa relação custo – eficácia apenas em zonas com incidência elevada de cólera.⁴¹ Este estudo aponta para áreas com incidência superior a 1 por 1000.

Na cidade da Beira, de 2000 a 2002, a incidência anual foi cerca de 8 – 9 por 1000, o que, segundo este critério, a torna potencialmente uma área onde o recurso à vacinação é custo – eficaz.

A campanha de vacinação em massa conduzida na cidade da Beira em 2003 permitiu a avaliação da exequibilidade e custo – eficácia da implementação da campanha.⁷⁴ Nesta campanha, dirigida a uma população de um bairro da cidade (20.000 indivíduos), correspondente a 1/25 da população total da cidade, o custo da campanha foi de cerca de 92.287 Euros (custo da vacina não contabilizado). O custo por indivíduo imunizado foi de cerca de 2,09 Euros, e variaria entre 4,88 Euros e 10,47 Euros (consoante o custo da vacina seja 1 Euro ou 3 Euros por dose). De facto, o custo da vacina mantém-se um dos principais factores que limitam a inclusão da vacinação na estratégia de controlo da cólera. ⁷⁴

Considerando um cenário hipotético de implementação da vacinação em massa na cidade da Beira, tendo como população alvo 500.000 indivíduos, segundo os princípios anteriormente descritos, então:

- Tendo em consideração a taxa anual de incidência de cólera de 0.8% e a eficácia protectora da vacina de cerca de 85% aos 6 meses, no primeiro ano haveria uma redução em cerca de 3.400 casos (taxa de incidência de 0.12%), sendo hipoteticamente toda a população vacinada. A isto acresce os efeitos acessórios não quantificados da vacinação: diminuição da gravidade dos casos de doença e eventual imunidade de grupo, que contribuem igualmente para a diminuição da morbimortalidade. De atentar que, apesar da recomendação de reforço de vacinação de 2/2 anos, a vacina mantém uma eficácia protectora de cerca de 60% aos 3 anos pós vacinação.
- Tendo em consideração a análise efectuada na campanha de vacinação em massa em na cidade da Beira acima referida, o custo da implementação seria de

1.045.000 Euros (não contabilizando o custo da vacina), variando entre 2.440.000 e 5.235.000 Euros (consoante o custo da vacina seja hipoteticamente 1 Euro ou 3 Euros por dose).

3– Manter o sistema de intervenção de emergência em situação de epidemia.

A implementação da vacinação não prescinde da manutenção do sistema de intervenção de emergência em situação de epidemia. Pelo contrário, ela é preconizada pela OMS como ferramenta complementar à estratégia clássica de controlo da cólera.

4 – Garantir e otimizar a vigilância epidemiológica.

No sistema de vigilância epidemiológica da cólera na cidade da Beira seria pertinente:

- Incluir análise regular e monitorização dos novos casos de cólera notificados e sua letalidade segundo os critérios definidos no ponto 1. Neste contexto, seria importante assegurar a notificação de todos os casos e que esta notificação seja feita com base em critérios uniformes, ou seja, segundo a definição de caso de cólera da OMS.
- Incluir uma vigilância e monitorização serológica da população, recorrendo ao doseamento dos anticorpos vibriocida, por exemplo através de rastreios seroepidemiológico regulares. Isto permitiria conhecer a evolução da imunidade na população, detectar focos populacionais de maior susceptibilidade e ajudar a prever as epidemias. Deste modo, poderia ser uma valiosa ferramenta na optimização de intervenções no âmbito da estratégia de controlo da cólera e na detecção de novas oportunidades de vacinação.

- Em cada caso suspeito de cólera proceder, idealmente, à confirmação microbiológica, assim como ao controlo e monitorização clínica, microbiológica e serológica dos contactos.

5 – Melhorar as condições de saneamento e de habitação das populações e promover a educação para a saúde.

As intervenções efectuadas com o objectivo de melhorar a qualidade e segurança da água e as condições sanitárias das populações estão de um modo geral documentadas com uma boa relação custo – eficácia.⁴¹ Aliás, estas intervenções são determinantes para o desenvolvimento dos países e controlo da cólera.

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- A seroprevalência de cólera (serogrupo O1), por doseamento de anticorpos vibriocida no soro, numa amostra de 136 indivíduos adultos residentes da cidade da Beira (Moçambique) foi 2,2%.
- Foram detectadas ambas as estirpes do serogrupo O1: Inaba (seroprevalência de 1,4%) e Ogawa (seroprevalência de 2,2%).
- Dado que a amostra é constituída apenas por indivíduos sem história prévia de vacinação contra a cólera, e que o poder vibriocida está correlacionado com a protecção contra a cólera, a seroprevalência obtida reflecte a imunidade adquirida dos indivíduos à infecção natural por *Vibrio cholerae* O1.
- Uma vez que a seroprevalência de cólera, obtida por poder vibriocida, em área endémica é indicador da susceptibilidade à infecção, a amostra em estudo tem elevada susceptibilidade à cólera por *Vibrio cholerae* O1.
- O estudo foi realizado numa amostra de conveniência, o que compromete a extrapolação dos resultados para a população em geral. Contudo, foi inovador, uma vez que foi o primeiro estudo de seroprevalência realizado na cidade da Beira, e foi um exemplo de sucesso de transferência tecnológica.
- É necessário um estudo de seroprevalência mais alargado, numa amostra representativa da população, para definir o real impacto da cólera na cidade da Beira.
- O poder vibriocida poder ter interesse na cidade da Beira como ferramenta de monitorização e serovigilância da população, integrado num sistema de vigilância epidemiológica. De facto, a sua utilização neste contexto poderá contribuir para melhor planear, definir e priorizar estratégias e áreas de

intervenção na prevenção e controlo das epidemias de cólera, nomeadamente identificar oportunidades para vacinação.

- A transferência tecnológica implicada neste estudo poderia ser igualmente equacionada na cidade da Beira.
- A cólera na cidade da Beira continua a assolar as populações e o seu controlo carece de uma abordagem multidisciplinar e de uma grande investimento a nível local e internacional, com implementação de estratégia com impacto a curto e longo prazo.
- O recurso à vacinação oral contra a cólera em áreas endémicas, como ferramenta de saúde pública complementar à estratégia de controlo da cólera, é amplamente discutido a nível internacional. Urge definir o seu potencial papel na estratégia de controlo da cólera da cidade da Beira, equacionando as vantagens, as implicações e possíveis obstáculos à sua implementação neste cenário específico.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO. Cholera vaccines. *Weekly epidemiological record*. 2001;76:117–124.
2. Kaper JB, Morris JG, Levine MM. Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995; 1:48–86.
3. Lacey SW. Cholera: calamitous past, ominous future. *Clinical Infectious Diseases*. 1995;20:1409–1419.
4. Sack DA et al. Cholera. *Lancet* 2004;363(9404):223–233.
5. Sanchez JL, Taylor DN. Cholera. *Lancet*. 1997;349:1825–1830.
6. Hunt MD et al. Seroepidemiology of cholera in gulf coastal Texas. *Appl Environ Microbiol*. 1988;54:1673–1677.
7. Lipp EK et al. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(4):757–770.
8. Daniel SO et al. The antigenic variation of *Vibrio cholera* in a newly – infected developing country. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75(2):299–301.
9. Faruque S et al. Emergence and evolution of *Vibrio cholera* O139. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1304–1309.
10. Rammamurthy T et al. *Vibrio cholera* O139 Bengal : odyssey of a fortuitous variant. *Microbes Infect* 2003;5(4):329–344.
11. Dodin A, Fournier JM. *Methodes de laboratoire pour le diagnostic du vibriion cholerique et des autres vibrions*. Institut Pasteur. 1992.
12. NCID/CDC. *Laboratory methods for the diagnosis of Vibrio cholerae*. CDC Washington.
13. Nato F et al. One step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(3):476–478.
14. Bhuiyan NA et al. Use of dipsticks for rapid diagnosis of Cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139 from rectal swabs. *J Clin Microbiol* 2003;41(8):3939–3941.
15. Mosley WH et al. A serological survey for cholera antibodies in rural east Pakistan: the distribution of antibody in the control population of a cholera vaccine field trial area and the relation of antibody titre to the pattern of endemic cholera. *Bull World Health Organ*. 1968;38:327–334.
16. Levine MM et al. Duration of infection – derived immunity to cholera. *J Infect Dis*. 1981;143:818–820.
17. Glass R et al. Seroepidemiological studies of El Tor cholera in Bangladesh : association of serum antibodies with protection. *J Infect Dis*. 1985;151:236–242.
18. Holmgren J et al. Mechanisms of disease and immunity in cholera : review. *J Infect Dis*. 1977;136:5105–5112.
19. Jertborn M et al. Saliva, breast milk and serum antibody responses as indirect measures of intestinal immunity after oral cholera vaccination or natural disease. *J Clin Microbiol*. 1986;24:203–209.
20. Clements ML et al. Magnitude, kinetics and duration of vibriocidal antibody response in North Americans after ingestion of *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis* 1982;145:465–473.

21. Viret JF et al. Mucosal and systemic immune responses in humans after primary and booster immunizations with orally administered invasive and noninvasive live attenuated bacteria. *Infection and Immunity*. 1999;67(7):3680–3685.
22. Qadri F et al. Immune response to the mannose sensitive hemagglutinin in patients with cholera due to *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Clin Diagn Labor Immunol*. 1997;4(4):429–434.
23. Qadri F et al. Comparison of immune responses in patients infected with *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Infection and Immunity*. 1997;65(9):3571–3576.
24. Jertborn M et al. Intestinal and systemic immune responses in humans after oral immunization with a bivalent subunit O1/O139 whole cell cholera vaccine. *Vaccine*. 1996;14(15):1459–1465.
25. Losonsky G et al. Factors influencing secondary vibriocidal immune responses : relevance for understanding immunity to cholera. *Infection and Immunity*. 1996;64(1):10–15.
26. Quiding M et al. Intestinal immune responses in humans: oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses and interferon γ production and evokes local immunological memory. *J Clin Investigation*. 1991;88:143–148.
27. Lewis DJM et al. The early cellular and humoral immune response to primary and booster oral immunization with cholera toxin B subunit. *Eur J Immunol*. 1991;21:2087–2094.
28. Mosley WH et al. Report of the 1966–67 cholera vaccine field trial in rural east Pakistan: results of the serological surveys in the study population – the relationship of case rate to antibody titre and estimate of the inapparent infection rate with *Vibrio cholerae*. *Bull World Health Organ*. 1969;40:187–197.
29. Khan MU et al. Vibriocidal titre in cholera cases and contacts : its value in assessing endemicity of or susceptibility to cholera. *Trop Geogr Med*. 1987; 39(3):271–275.
30. Bendib A et al. Enquête séro – épidémiologique sur le cholera El Tor dans une région endémique en Algérie. *Bull Soc Pathol Exot*. 1994 ;87(3):143–147.
31. Bendib A. Intérêt de la recherche des anticorps vibriocides en zones d'endemie à *Vibrio cholera* O1 . *Bull Soc Pathol Exot*. 1994 ;87(1):33–37.
32. Levine MM et al. Enzyme linked immunosorbent assay to measure antibodies to purified heat labile enterotoxins from human and porcine strains and to cholera toxin : application in serodiagnosis and seroepidemiology. *J Clin Microbiol*. 1985;21:174–179.
33. Levine MM et al. Duration of serum antitoxin response following *Vibrio cholerae* infection in North Americans: relevance for seroepidemiology. *Am J Epidemiol*. 1981;114:348–354.
34. Hallander HO et al. Calibrated serological techniques demonstrate significant different serum response rates to an oral killed cholera vaccine between Swedish and Nicaraguan children. *Vaccine*. 2002;21:138–145.
35. Koike N et al. Rapid and differential detection of two analogous enterotoxins of *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by a modified enzyme linked immunosorbent assay. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1997;17:21–25.

36. Tacket CO et al. Randomized, double blind, placebo controlled, multicentered trial of the efficacy of a single dose of live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in preventing cholera following challenge with *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba three months after vaccination. *Infect Immun* 1999;67(12):6341–6345.
37. Clemens JD et al. Impact of B subunit killed whole cell and killed whole cell only oral vaccines against cholera upon treated diarrhoeal illness: mortality in an area endemic for cholera. *Lancet* 1988;1(8599):1375–1379.
38. Clemens JD et al. Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh: results from a three year follow up. *Lancet* 1990;335(8684):270–273.
39. Clemens JD et al. Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh. *Lancet* 1986;2(8499):124–127.
40. WHO. *WHO Global Task Force on Cholera control*. 2003.
41. Global task force on cholera control. *Cholera vaccines : a new public health tool ?* Report. World Health Organization. 2002.
42. WHO. Cholera, 2003. *Weekly epidemiological record*. 2004;79:281–288.
43. Ivanoff B et al. Vaccins et vaccinations anticholériques. *Bull Soc Pathol Exot*. 2002;95(5):355–358.
44. Ryan ET et al. Cholera vaccines. *Clin Infect Dis* 2000;31(2):561–565.
45. Calain P et al. Can oral cholera vaccination play a role in controlling a cholera outbreak? *Vaccine* 2004;22:2444–2451.
46. Van Loon FLP et al. Field trial of inactivated oral cholera vaccines in Bangladesh: results from 5 years of follow up. *Vaccine*. 1996;14(2):162–166.
47. Clemens JD et al. Evidence that inactivated oral cholera vaccines both prevent and mitigate *Vibrio cholerae* O1 infections in a cholera endemic area. *J Infect Dis* 1992;166:1029–1034.
48. Clemens JD et al. Cross protection by B subunit whole cell cholera vaccine against diarrhea associated with heat labile toxin producing enterotoxigenic *Escherichia coli*: results of a large scale field trial. *J Infect Dis* 1988;158 (2):372–377.
49. Sanchez JL et al. Protective efficacy of whole – cell/recombinant – B – subunit cholera vaccine in Peruvian military recruits. *Lancet*. 1994;344:1273–1276.
50. Ortigao – de – Sampaio MB et al. Increase in plasma viral load after cholera immunization of HIV – infected subjects. *AIDS*. 1998;12(14):F145–150.
51. Lewis DJ et al. Immune response following oral administration of cholera toxin B subunit to HIV – infected UK and Kenyan subjects. *AIDS*. 1994;8(6):779–785.
52. Levine MM et al. Safety, immunogenicity and efficacy of recombinant live oral vaccines, CVD 103 and CVD 103-HgR. *Lancet*. 1988;August 27:467–470.
53. Perry RT et al. A single dose of live oral cholera vaccine CVD 103-HgR is safe and immunogenic in HIV – infected and HIV – non infected adults in Mali. *Bull World Health Organ*. 1998;76(1):63–71.
54. Trach DD et al. Investigations into the safety and immunogenicity of a killed oral cholera vaccine developed in Viet Nam. *Bull World Health Organ*. 2002;80(1):2–8.
55. Legros D et al. Mass vaccination with a two – dose oral cholera vaccine in a refugee camp. *Bull World Health Organ*. 1999;77(10):837–842.
56. WHO. Cholera, 2001. *Weekly epidemiological record*. 2002;77:257–268.

57. Brown V et al. Prise en charge des épidémies de choléra dans un champ de réfugiés. *Bull Soc Pathol Exot* 2002 ; 95(5):351–354.
58. Dray X et al. Une épidémie de choléra à Djibouti (Mai 2000 – Janvier 2001). *Med Trop* 2002;62(5):497–502.
59. Glass RI et al. Cholera in Africa : lessons on transmission and control for Latin America. *Lancet*. 1991;338(8770):791–795.
60. Legros D et al. Epidemiology of cholera outbreak in Kampala, Uganda. *East Afr Med J* 2000;77(7):347–349.
61. Moren A. et al. Practical field epidemiology to investigate a cholera outbreak in a Mozambican refugee camp in Malawi, 1988. *J Trop Med Hyg* 1991;94(1):1–7.
62. Piarroux R. Le choléra : épidémiologie et transmission. Expérience tirée de plusieurs interventions humanitaires réalisées en Afrique, dans l’Océan Indien et en Amérique Centrale. *Bull Soc Pathol Exot* 2002;95(5):345–350.
63. WHO. *Report on cholera control programme in Mozambique*. Geneva: World Health Organization Global Task Force on Cholera Control 2003.
64. Bateman C. Mozambique cholera will affect region. *S Afr Med J* 2002 ; 92(2) :104–106.
65. <http://www.who.int/csr/don>
66. WHO. Mozambique: summary of country profile for HIV/AIDS treatment scale up 2004. 2004
67. Boutonnier A et al. A simple and convenient microtiter plate assay for the detection of bactericidal antibodies to *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio cholerae* O139. *J Microbiol Met* 2003;55:745–753.
68. Thomas JC et al. *Epidemiologic methods for the study of infectious diseases*. Oxford University Press 2001.
69. Rey JL et al. HIV seropositivity and cholera in refugee children from Rwanda. *AIDS* 1995; 9(10):1203–1204.
70. Lucas MES et al. Effectiveness of mass oral cholera vaccination in Beira, Mozambique. *NEJM* 2005;352(8):757–767.
71. Ali M et al. Herd immunity conferred by killed oral cholera vaccines in Bangladesh: a reanalysis. *Lancet* 2005; 366:44–49.
72. Sack D. Herd protection and herd amplification in cholera. *J Health Popul Nutr* 2006;24(1):1–5.
73. WHO. Cholera, 2005. *Weekly epidemiological record*. 2006;31:297–308.
74. Cavailler P et al. Feasibility of a mass vaccination campaign using a two-dose oral cholera vaccine in a urban cholera –endemic setting in Mozambique. *Vaccine* 2006;24:4890–4895.

ANEXOS

Anexo 1 – Fórmulas para realização dos meios e produtos laboratoriais

MEIO DE BRUCELLA COM 10% DE GLICEROL

Meio de conservação de *Vibrio cholerae* a -80°C

Composição

- | | |
|--|------------|
| – Meio de Brucella (BECTON DICKINSON 211088) | 28 g |
| – Glicerol | 100 ml |
| – Água destilada | Qb 1000 ml |

Modo de preparação

- Dissolver o pó num recipiente com um pouco de água
- Adicionar o glicerol, misturando bem
- Completar com a água até 1000 ml de solução
- Ajustar o pH da solução a $7 \pm 0,2$, com uma solução de hidróxido de sódio
- Distribuir por tubos, cerca de 5 ml por tubo
- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos
- Distribuir pelas placas de Petri, cerca de 20 ml por placa

Prazo de validade

- 1 ano

Modo de preparação cedido pelo Instituto Pasteur, Paris – Unidade de Cólera e Vibriões

GELOSE NUTRITIVA ALCALINA (GNA)

Composição

- Peptona de caseína de carne E2 (ORGANO TECHNIE 20 g 19501)
- Agar (BECTON DICKINSON 214010) 15 g
- Cloreto de sódio 5 g
- Água destilada 1000 ml

Modo de preparação

- Num recipiente colocar os diversos componentes e adicionar a água destilada
- Homogeneizar a solução a quente
- Ajustar o pH da solução a $8,2 \pm 0,2$, com uma solução de hidróxido de sódio
- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos
- Distribuir pelas placas de Petri, cerca de 20 ml por placa
- Colocar na estufa a 37°C durante 24 horas
- Verificar o meio e armazenar em câmara fria

Prazo de validade

- 1 mês

Modo de preparação cedido pelo Instituto Pasteur, Paris – Unidade de Cólera e Vibriões

SORO FISIOLÓGICO TAMPONADO

Composição

– Na ₂ HPO ₄	4,52 g
– KH ₂ PO ₄	0,40 g
– NaCl	7,20 g
– Água destilada	Qb 1000 ml

Modo de preparação

- Adicionar os componentes com água num recipiente
- Homogeneizar a solução
- Ajustar o pH da solução a $7,5 \pm 0,2$, com uma solução de hidróxido de sódio
- Completar com a água para perfazer 1000 ml de solução
- Distribuir por tubos, cerca de 9 ml por tubo
- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos

Prazo de validade

- 1 ano

Modo de preparação cedido pelo Instituto Pasteur, Paris – Unidade de Cólera e Vibriões

MEIO LURIA BERTANI (MEIO LB)

Composição

- | | |
|--|---------|
| – Extracto de levedura (BECTON DICKINSON 212750) | 5 g |
| – Triptona (BECTON DICKINSON 211705) | 10 g |
| – NaCl | 5 g |
| – Água destilada | 1000 ml |

Modo de preparação

- Dissolver os pós num recipiente com a água
- Homogeneizar a solução
- Ajustar o pH da solução a $7 \pm 0,2$, com uma solução de hidróxido de sódio
- Distribuir por recipientes, cerca de 50 ml por recipiente
- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos

Prazo de validade

- 1 ano

Modo de preparação cedido pelo Instituto Pasteur, Paris – Unidade de Cólera e Vibriões

Anexo 2 – Instrumentos de notação

Instrumento de notação 1 (preenchido no acto da selecção da amostra e colheita da amostra de sangue venoso)

Estudo de seroprevalência de Cólera numa população adulta – Cidade da Beira
(Moçambique)

Inquérito número	Centro de Saúde
	<input type="checkbox"/> Ponta Gea
	<input type="checkbox"/> Munhava
Nome	
Idade (anos)	Sexo
	<input type="checkbox"/> Masculino
	<input type="checkbox"/> Feminino
Profissão	Vacinado contra a cólera?
	<input type="checkbox"/> Sim
	<input type="checkbox"/> Não

Instrumento de notação 2 (preenchido no acto de realização dos doseamentos serológicos)

Estudo de seroprevalência de Cólera numa população adulta – Cidade da Beira
(Moçambique)

Número	Anticorpos Vibriocida O1 Ogawa(título)	Anticorpos vibriocida O1 Inaba(título)
--------	---	---